

Untersuchungen über Struktur und Wirkungsweise  
natürlich vorkommender und partialsynthetischer  
Ampullosporine

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-  
Universität Jena

Von

Matthias Kronen, staatl. Geprüfter Lebensmittelchemiker

Geboren am 04.03.69 in Dorsten

**Gutachter:**

1. Prof. Dr. Reißmann

2. Prof. Dr. Brückner

3. Dr. Liebermann

Tag der Doktorprüfung: 12.11.2003

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.12.2003

Prof. Dr. Udo Gräfe zum Andenken gewidmet

# I Zusammenfassung

Das Peptidantibiotikum Ampullosporin besitzt interessante biologische Aktivitäten. Es induziert die Pigmentbildung beim Pilz *Phoma destructiva*, bewirkt eine Absenkung der Körpertemperatur und verminderte Spontanaktivität bei Mäusen. Beide Testsysteme, insbesondere der Tierversuch, zeigen neuroleptische Wirkung an. Diese konnte durch weitere Tests an Ratten bestätigt werden.

Die vorliegende Arbeit beschreibt

1. Die Methodenentwicklung geeigneter Fermentationsbedingungen zur Gewinnung von Ampullosporin im Labormaßstab und in Gramm-Mengen. Als geeignete Methode zur Gewinnung größerer Mengen Ampullosporin konnte die Feststoff-Fermentation etabliert werden.
2. Die Auftrennung des mikroheterogenen Ampullosporinkomplexes mittels geeigneter HPLC-Methoden in fünf Fraktionen, den Reinsubstanzen Ampullosporin A-D und dem Ampullosporin E-Komplex.
3. Die Strukturaufklärung dieser Substanzen mittels MS<sup>n</sup>, insbesondere des Ampullosporin E-Komplexes, aus dem mit dieser Methode vier verschiedene Positionsisomere, die Ampullosporine E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub>, identifiziert werden konnten.
4. Die gerichtete Biosynthese. Es wurde gezeigt, dass das Spektrum an Homologen und Isomeren nicht durch gezielte Fütterung von Bausteinen verändert werden kann. Eine Veränderung der Produktionsrate konnte je nach Baustein erreicht werden.
5. Die enzymatische Stabilität. Ampullosporin zeigt eine hohe Stabilität gegen die hydrolytische Spaltung durch Proteasen.
6. Die Bestimmung der Kristallstruktur. Durch ein geeignetes Verfahren konnten Kristalle von Ampullosporin A gewonnen werden. Die Kristallstruktur wurde mit Hilfe der Röntgenkristall-Strukturanalyse aufgeklärt. Aus den gewonnenen Daten konnten Rückschlüsse für die Konformation in Lösung und in der Membran gewonnen werden.
7. Die chemische Modifizierung des Ampullosporins A an funktionellen Gruppen, die in der Röntgenkristall-Strukturanalyse als wichtig für die biologische Wirksamkeit angesehen wurden. Es wurden der N-Terminus spezifisch mit N-Bromsuccinimid abgespalten, die Glutaminseitenketten methyliert und der C-Terminus verestert.
8. Durch die Variation der Lösungsmittel in den Circular dichroismus-Messungen konnte gezeigt werden, dass Ampullosporin in seiner Konformation flexibel auf die Umgebung reagiert. Die Unterschiede in den CD-Spektren und den Parametern haben gezeigt, dass

die Bio- und die Membranaktivität von dem Vorhandensein bestimmter struktureller Merkmale, wie der Helizität, stark abhängig sind. Modifikationen in der Sequenz, die diese deutlich verändern, führen zu biologisch inaktiven Derivaten

9. Die Messung der Membranaktivität. Ampullosporin ist ein spannungsabhängiger ionophorer Porenbildner. Die Bestimmung der Membranaktivität der hier beschriebenen Ampullosporin-Analoga erfolgte an einer artifiziellen Bilayer-Lipid-Membran. Zwischen der Wirkung auf die Membran und den biologischen Testsystemen konnte eine Korrelation festgestellt werden. So sind die Analoga, die biologisch dem Ampullosporin A als Standardsubstanz äquivalent sind, auch hier mit Ampullosporin A vergleichbar. Ampullosporin C ist in allen drei Tests schwächer wirksam. Die biologisch inaktiven Substanzen bilden keine Poren in der Membran aus.
10. In den biologischen Tests „Phomatest“ und „Hypothermie-Test“ konnten Korrelationen zwischen Struktur und Wirkung festgestellt werden. Der N-Terminus mit dem acetylierten L-Tryptophan ist wichtig für die biologische Wirksamkeit, Änderungen in der Sequenz, z. B. der Austausch von Aib gegen L-Ala, können zu Einschränkungen in der Aktivität führen. Blockierung der Amidgruppen der Glutamine zerstören die biologische Aktivität. Der C-Terminus hat auf die beschriebenen Testsysteme deutlich geringeren Einfluß.
11. Neuroparmakologische Studien. Grecksch und Mitarb. haben gezeigt, dass Ampullosporin A als atypisches Neuroleptikum wirkt. Hierbei wird nicht der dopaminerge D<sub>2</sub>-Rezeptor von Ampullosporin A antagonistisch blockiert, sondern der NMDA-Rezeptor beeinflusst.  
  
Ob diese Beeinflussung durch eine spezifische Bindung an den Rezeptor ausgelöst wird oder das Ampullosporin aufgrund seiner membranmodifizierenden Eigenschaften wirkt, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

## II Liste der verwendeten Abkürzungen

<b>Ac</b>	<b>Acetyl</b>
A-Domäne	Adenylierungsdomäne
<b>Aib / U</b>	<b><math>\alpha</math>-Aminoisobuttersäure</b>
<b>Ala / A</b>	<b>Alanin</b>
<b>Amp</b>	<b>Ampullosporin</b>
<b>AMPA</b>	<b><math>\alpha</math>-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat</b>
<b>b.w.</b>	<b>Körpergewicht</b>
<b>BLM</b>	<b>Bilayer-Lipid-Membran</b>
br	breit (Bandenbreite im NMR)
<b>Calcd.</b>	<b>Berechnetes Molgewicht (bei HR-ESI)</b>
<b>CD</b>	<b>Circulardichroismus</b>
C-Domäne	Kondensationsdomäne
CID	„collision induced decomposition“ bzw. „collision induced decay“
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dublett (NMR)
DAD	„diode array detector“ (Diodenarray- bzw. Streulicht-Detektor)
DC	Dünnschicht-Chromatographie bzw. -Chromatogramm
<b>DCC</b>	<b>Dicyclohexylcarbodiimid</b>
<b>dd</b>	<b>Doppeldublett (NMR)</b>
D-H...A	Wasserstoff-Donor und -Akzeptor
<b>DMAP</b>	<b>Dimethylaminopyridin</b>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	„electron impact“ (Elektronenstoß)- Ionisation
<b>EPS</b>	<b>extra pyramidalen Störungen</b>
ESI	„electrospray ionization“
EtOH	Ethanol
FAB	„fast atom bombardment“
<b>Gln / Q</b>	<b>Glutamin</b>
<b>Glu / E</b>	<b>Glutaminsäure</b>
<b>Gly / G</b>	<b>Glycin</b>
HMBC	Heteronuclear Multibond Connectivity

HPLC	„high performance liquid chromatography“ (Hochauflösende Flüssig-chromatographie)
HSQC	<b>Heteronuclear Single Quantum Coherence</b>
HR	<b>„high resolution“ (Hochauflösung bei der Präzisionsmassenbestimmung)</b>
J	<b>Isovalin</b>
LC	„liquid chromatography“ (Flüssigkeitschromatographie)
LC/MS	Kopplung der HPLC mit einem Massenspektrometer
Leu / L	<b>Leucin</b>
Leuol	<b>Leucinol</b>
M	Molekülion bzw. Mol
m	<b>Multiplett (NMR)</b>
$m/z$	Quotient aus Masse/Ladungszahl
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MK-801	<b>Dizocilpin</b>
MP	<b>Schmelzpunkt</b>
MRE	<b>mean residue ellipticity</b>
MS	Massenspektrometer bzw. Massenspektrometrie
MS/MS	Erste Generation von Tochterionen im Triple-Quadrupol-MS ( $MS^2$ )
$MS^n$	Ion der n-ten Tochtergeneration im ESI-Ion-Trap-MS
NBS	<b>N-Bromsuccinimid</b>
NMDA	<b>N-Methyl-D-Aspartat</b>
NMR	Kernmagnetische Resonanz
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NRPS	nonribosomale Peptidsynthetase
O	<b>Hydroxyprolin</b>
ORD	<b>optische Rotationsdispersion</b>
Phe / F	<b>Phenylalanin</b>
Pro / P	<b>Prolin</b>
q	<b>Quartett (NMR)</b>
$R_f$	Retentionsfaktor bei der DC: Quotient aus Laufstrecke der Substanz und Laufstrecke der Lösungsmittelfront
RP	„reversed phase“ (Umkehrphase)
RSA	<b>Röntgenkristall-Strukturanalyse</b>

<b>S</b>	<b>Serin</b>
<b>s</b>	<b>Singulett (NMR)</b>
<b>SDS</b>	<b>Na-Dodecylsulfat</b>
<b>SMH-model</b>	<b>Shai-Matsuzaki-Huang model</b>
<b>SSF</b>	<b>Feststoff-Fermentation</b>
<b>t</b>	<b>Triplett (NMR)</b>
<b>T-Domäne</b>	<b>Terminierungsdomäne</b>
<b>TFA</b>	<b>Trifluoressigsäure</b>
<b>TFE</b>	<b>Trifluorethanol</b>
<b>TPHB</b>	<b>Triphenylphosmoniumhydrobromid</b>
<b>t<sub>R</sub></b>	<b>Retentionszeit einer Substanz in der HPLC [min]</b>
<b>Trp / W</b>	<b>Tryptophan</b>
<b>V</b>	<b>Valin</b>



## **Zusammenfassung**

### **Liste der verwendeten Abkürzungen**

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Pilze als Quelle biologisch aktiver Substanzen	1
1.2. Peptaibole: Strukturmerkmale, Quellen, Biosynthese, Klassifizierung, biologische Aktivität, Membranmodifizierende Eigenschaften	1
1.3. Schizophrenie: Rezeptoren, Medikamentation	7
1.4. Ampullosporin: Struktur, Bildner, biologische Aktivität	10
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>14</b>
3.1. Liste der verwendeten Chemikalien und Geräte	14
3.2. Allgemeine Nachweismethoden	18
3.2.1. Dünnschichtchromatographie	
3.2.2. Hochleistungsflüssigchromatographie	
3.3. Fermentation des Ampullosporins	19
3.3.1. Oberflächenkultivierung	
3.3.2. Emerskultivierung	
3.3.3. Submerskultivierung	
3.3.4. Festbettkultivierung	
3.4. Extraktion des Ampullosporins	20
3.5. Isolierung des Ampullosporins	20
3.6. Auftrennen des Ampullosporinkomplexes	21
3.7. Strukturaufklärung der neuen Ampullosporine	22
3.7.1. Massenspektrometrie	
3.7.2. Kernresonanzspektroskopie	
3.7.3. Chiralitätsbestimmung	
3.8. Drehwertbestimmung	24
3.9. Schmelzpunktbestimmung	24
3.10. Vorläufer orientierte Biosynthese	25
3.10.1. Synthetisches Medium	
3.10.2. Fütterung der Aminosäuren	
3.11. Derivatisierung des Ampullosporins A	26
3.11.1. Abspaltung des Tryptophans	
3.11.2. Methylierung der Glutaminseitenketten	

3.11.3.	Reaktionen am C-Terminus	
3.11.3.1.	Mit Essigsäure	
3.11.3.2.	Mit Triacetylglucal	
	<b>Bestimmung der enzymatischen Stabilität</b>	<b>28</b>
	<b>Röntgenkristall-Strukturanalyse von Ampullosporin A</b>	<b>29</b>
	<b>Circulardichroismus</b>	<b>29</b>
3.12.	Biologische Testung	30
3.12.1.	Induktion der Pilzmorphogenese (Phomatest)	
3.12.2.	Bestimmung der Absenkung der Körpertemperatur (Hypothermietest)	
3.12.3.	Radioligand-Bindungsassay	
3.13.	Messung der Membranaktivität	32
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>34</b>
	<b>Fermentation und Gewinnung von Ampullosporin A</b>	<b>34</b>
	<b>Isolierung des Ampullosporins</b>	<b>35</b>
	<b>Auftrennen des Ampullosporinkomplexes</b>	<b>36</b>
	<b>Strukturaufklärung der NebenkompONENTEN</b>	<b>38</b>
	<b>Massenspektrometrische Methoden</b>	
	<b>Allgemeine Bemerkungen zur Massenspektrometrie</b>	
	<b>Auswertung der MS</b>	
	<b>Kernresonanzspektroskopie</b>	
	<b>Chiralitätsbestimmung</b>	
	<b>Vorläuferorientierte Biosynthese</b>	<b>42</b>
	<b>Allgemeine Bemerkungen zur gerichteten Biosynthese</b>	
	<b>Gerichtete Biosynthese</b>	
4.1.	Derivatisierung des Ampullosporins A	44
4.1.1.	Abspaltung des Tryptophans	
4.1.2.	Methylierung der Glutaminseitenketten	
4.1.3.	Reaktionen am C-Terminus	
4.1.3.1.	Mit Essigsäure	
4.1.3.2.	Mit Triacetylglucal	
4.2.	Bestimmung der enzymatischen Stabilität von Ampullosporin A	48
4.3.	Kristallstruktur von Ampullosporin A	49
4.4.	Circulardichroismus	54
4.4.1.	Allgemeine Bemerkungen zum Circulardichroismus	

4.4.2.	Circulardichroismus-Untersuchung	
4.5.	Biologische Testung	62
<b>Induktion der Pilzmorphogenese (Phomatest)</b>		
<b>Bestimmung der Absenkung der Körpertemperatur (Hypothermietest)</b>		
4.5.1.	Rezeptorbindung des Ampullosporins	
4.6.	Membranaktivität	65
4.6.1.	Allgemeine Bemerkungen zur Porenbildung	
4.6.2.	Messung der Membranaktivität	
4.6.3.	Modell der Ampullosporinporenbildung	
4.6.4.	Porenbildung, Sekundärstruktur und biologische Aktivität	
<b>5.</b>	<b>Literatur</b>	73
<b>6.</b>	<b>Abbildungen und Tabellen</b>	85
6.1.	Allgemeine physikalische Daten der Ampullosporine B-E und der Derivate	86
6.2.	ESI-Tandem-MS der Ampullosporine B-E und der Derivate	87
6.3.	Chemische Verschiebungen der Ampullosporine B-E und der Derivate	93
6.4.	Kristallographische Angaben und Daten der RSA des Ampullosporins A	111
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	113

# Einleitung

## 1.1. Pilze als Quelle biologisch aktiver Substanzen

Pilze sind aktive Produzenten von Sekundärmetaboliten. Diese werden vielfach in der Medizin und Landwirtschaft eingesetzt.

Traditionell werden Pilze in der Lebensmittelproduktion genutzt. Beispiele dafür sind *Saccharomyces cerevisiae* als Alkoholproduzent und *Penicillium roquefortii* in der Käseherstellung.

Das sicherlich bekannteste Beispiel für einen Pilzmetaboliten ist das Penizillin G. Fleming beobachtete 1928, dass *P. notatum* das Wachstum von Staphylokokkenkulturen hemmte [Habermehl, Hammann, 1992]. 1940 gelang es den Arbeitsgruppen von Chain und Florey den Reinstoff zu isolieren [Nuhn, 1997].

Weitere Beispiele für klinisch relevante Pilzmetabolite sind das Cephalosporin C aus *Cephalosporium acremonium* und das Cyclosporin aus *Tolypocladium inflatum* [Arora, Elander & Mukerji, 1992].

## 1.2. Peptaibole

### Strukturmerkmale

Auch die Peptaibole sind aus Pilzkulturen gewonnene Sekundärmetabolite. Es handelt sich hierbei um lineare Peptide einer Länge von fünf bis zwanzig Aminosäuren [Whitmore, Chugh, 2003]. Die wesentlichen Charakteristika dieser Substanzklasse sind im Namen Peptaibol genannt. Es handelt sich um *Peptide*, die die nicht proteinogene Aminosäure  $\alpha$ -Aminoisobuttersäure enthalten und durch einen zum Alkohol reduzierten C-Terminus und durch einen acetylierten N-Terminus charakterisiert sind. Neben Aib wird in manchen Sequenzen das ebenfalls nicht proteinogene Isovalin eingebaut. Es unterscheidet sich von Aib durch eine Ethyl- statt einer Methygruppe in der Seitenkette.

Mit den Lipopetaibolen und Lipoaminopeptiden werden die Peptaibole zu den Peptaibiotika zusammengefasst [Degenkolb et al., 2003].

## Quellen

Peptaibole werden von verschiedenen imperfekten Pilzen in Kultur produziert. Meist handelt es sich um auf Pflanzen oder Pilzen parasitierende Arten der Gattungen *Trichoderma*, *Emericellopsis* und *Acremonium* [Kubicek, 1998]. Beispiele für Peptaibole aus *Trichoderma*-Arten sind das Alamethicin F50 [Brückner et al., 1984] und die Longibrachine [Leclerc et al., 2001]. Aber auch die teleomorphen Formen wie *Hypocrea peltata* (Hypelcin) [Fujita et al., 1994] können als Quellen für Peptaibole dienen.

Es sind sich in der Literatur auch Basidiomyceten, in denen Peptaibole gefunden wurden, beschrieben. Beispiele sind die Tylopeptine, die aus *Tylophilus neofellus* stammen [Lee et al., 1999 (b)] und das Boletusin aus *Boletus* spp. [Lee et al., 1999 (a)]. Ob sie aber nicht von einer Infektion der Pilze mit Saprophyten stammen, ist in der Literatur umstritten [Degenkolb et al., 2003]. Zumal die Boletusine sehr hohe Analogien zu den Chrysosperminen (s. Tab. 1.2.1), die in *Apiocrea chrysospermum* gefunden wurden, haben und es sich bei *Tylophilus* und *Boletus* um bevorzugte Wirtspilze der Gattung *Sepedonium* handelt [Gams, 2003; Sahr, 1999].

## Biosynthese von Peptaibolen

$\alpha$ -Aminoisobuttersäure ist eine nicht proteinogene Aminosäure. Dies läßt den Schluß zu, dass Peptaibole nicht über die für Peptide übliche ribosomale Biosynthese gebildet werden. Deshalb wird schon seit ca. 25 Jahren ein nonribosomaler Biosyntheseweg über einen Multienzymkomplex postuliert [Mohr, Kleinkauf, 1978]. Vor kurzem konnte auch die erste Synthetase aus *Trichoderma virens* isoliert und aufgeklärt werden [Wiest et al., 2002].

Dieser Syntheseweg verläuft über nonribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) nach dem Thiotemplat-Mechanismus [Lipmann, 1973]. Die NRPS ist aus einzelnen Modulen aufgebaut. Diese erkennen, binden und verknüpfen ihre jeweilige Substrataminosäure [Kleinkauf & v. Döhren 1987, 1990; Zuber, 1991; Mootz & Marahiel, 1997]. Die Aminosäuren stammen aus den Vakuolen der Zellen [Roos, 1997]. Am Schluß wird das fertige Peptid am C-Terminus durch Hydrolyse oder Zyklisierung abgespalten. Den ganzen Vorgang kann man sich ähnlich einer Fließbandproduktion vorstellen. Daher auch der englische Fachbegriff “assembly line” [Keating & Walsh, 1999; Cane et al., 1998].

Die Module sind in weitere Untereinheiten, den drei Domänen, organisiert. Zunächst wird die spezifische Aminosäure oder das Peptidfragment von der Adenylierungs(A)-Domäne als Aminoacyladenylat gebunden, dann wird an der Thiolierungs (T)-Domäne die nächste

Aminosäure kovalent durch Thioesterbindung gekoppelt. Schließlich katalysiert die Kondensations (C)-Domäne die Kondensation mit der nächsten Aminosäure am Nachbarmodul (Abb. 1.1.1), [Cane, 1997; v. Döhren, 1999].

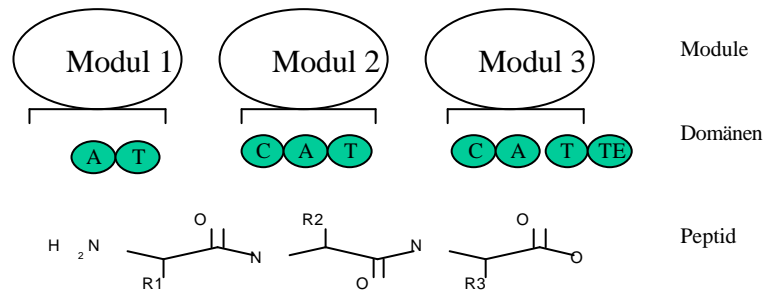


Abb. 1.2.1.: Schematische Darstellung einer nonribosomalen Peptidsynthase. A: Adenylierungsdomäne, T: Thiolierungsdomäne, C: Kondensationsdomäne und TE: Terminierungsdomäne. nach Schwarzer & Mahariel, 2001

Der Aufbau der Peptide erfolgt vom N- zum C-Terminus. Die Substraterkennung erfolgt in der A- und in der T-Domäne, ist aber weit weniger spezifisch als in der ribosomalen Peptidbiosynthese. Dadurch erklärt sich, dass die meisten Peptaibole Gemische von Homologen und Positionsisomeren sind („microheterogenität“) [Leclerc et al., 2001]).

### Klassifizierung der Peptaibole

Das wohl bekannteste Peptaibol ist Alamethicin. Seine Sequenz und weitere Beispiele sind in Tabelle 1.1.1 dargestellt.

Tab 1.1.1: Name, Sequenz und Literaturangabe einiger bekannter Peptaibole

Name	Sequenz	Literatur
Alamethicin F50	Ac-U-P-U-A-U-A-Q-U-V-U-G-L-U-P-V-U-U-Q-Q-F-OH	Brueckner et al., 1984
Chrysospermin C	Ac-F-U-S-U-J-L-Q-G-U-U-A-A-U-P-U-U-U-Q-W-OH	Dornberger et. al., 1995
Antiamoebin I	Ac-F-U-U-U-J-G-L-U-U-O-Q-J-O-U-P-F-OH	Brueckner et al., 1984
Zervamicin ZIB	Ac-W-V-E-J-I-T-U-L-U-O-Q-U-O-U-P-F-OH	Rinehart et. al., 1981

Mittlerweile sind über 300 Peptaibolsequenzen gefunden worden [Whitmore, Chugh, 2003] und sind in einer Internet-Datenbank unter der Adresse <http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.htm> abrufbar.

Die große Zahl an Peptaibolen kann systematisiert werden. Dafür bieten sich besonders die Unterschiede in der Länge der Aminosäuresequenz an. Fujita et al. [1994] teilen die Peptaibole in drei Gruppen ein. Zunächst die Gruppe der langen Peptaibole mit 18-20 Aminosäuren in der Sequenz, dann die kurzen mit 5-17 Aminosäuren.

Davon abgegrenzt werden als dritte Gruppe die Lipopeptaibole. Diese sind am N-Terminus statt mit einem Acetylrestes mit einer längerkettigen Fettsäure kondensiert, beispielhaft sei das Trikonigin KB I [Auvin-Guette et al., 1993] genannt.

Eine weitere Möglichkeit der Klassifizierung ist die Einteilung nach Homologien in der Aminosäuresequenz [Chugh et al., 2001]. Hieraus ergeben sich neun Unterfamilien.

Unterfamilie 1 mit etwa 120 Sequenzen beinhaltet die „langen“ Peptaibole, wie Alamethicin oder Chrysospermin. Typischerweise tragen sie in Position sechs oder sieben einen Glutaminrest und im C-terminalen Bereich weitere Glutamin- oder Glutaminsäurereste und einen Prolinrest an Position 13 oder 14.

Die Unterfamilien 2 und 3 sind der ersten Familie ähnlich. Mit 14 bis 16 Aminosäuren in der Sequenz sind sie deutlich kürzer. In Unterfamilie 2 und 3 finden sich an beiden Termini aromatische Aminosäuren, außerdem tritt neben Prolin auch Hydroxyprolin auf. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist in Position sechs, hier findet sich in Unterfamilie 3 Threonin. Beispiele für Familie 2 sind Antiamoebin [Brückner et al., 1984] und die Bergofungine [Berg et al., 1996], zu Familie 3 gehört z. B. Zervamicin [Rinehart et al., 1981].

Unterfamilie 4 weist außergewöhnliche Eigenschaften auf. Die Kettenlänge beträgt entweder 11 oder 14 Aminosäuren. Sie enthält weder aromatische Aminosäuren noch solche, die Ladungen tragen können. Hierzu gehören Harzianin [Rebuffat et al., 1995] und Trichorovin [Wada et al. 1995].

Die folgenden Familien sind sehr viel kleiner. Familie 5 besteht aus bisher fünf Peptaibolen. Sie haben eine Kettenlänge von sieben bis elf Aminosäuren. Die Vertreter dieser Familie haben einen hohen Anteil an Glycin, es fehlen jedoch die sonst häufigen Iminosäuren. Trichogin [Auvin-Guette et al., 1992] ist ein Vertreter dieser Gruppe. Da der N-Terminus nicht acetyliert, sondern mit Octansäure verestert ist, handelt es sich um ein Lipopeptaibol.

Familie 6 besteht aus Ampullosporin [Ritzau et al., 1997] und Tylopeptin [Lee et al., 1999 (a)]. Typisch ist das Tryptophan in Position 1.

Familie 7 besteht aus der LP237-Gruppe, drei Lipopeptaibolen, die aus dem bodenbewohnenden Saprophyten *Tolypocladium geodes* gewonnen wurden [Tsantrizos et al., 1996]. Die letzten beiden Unterfamilien 8 und 9 bestehen jeweils aus einer einzigen Sequenz; zum einen dem Clonostachin [Chikanishi et al., 1997] und dem Peptaibolin [Hülsmann et al., 1998]. Letzteres wurde aus dem gleichen Stamm wie das Ampullosporin isoliert.

## Biologische Aktivität

Typischerweise sind Peptaibole aktiv gegen grampositive Bakterien und Pilze. Dies ist beispielsweise für die Alamethicine, Zervamicine [Jen et al., 1987], die Harzianine [Rebuffat et al., 1995], Cephaibole [Schiell et al., 2001] und Stilboflavine [Jaworski et al., 2001] beschrieben. Sie wirken auch oft wie die Trichorzine [Beven et al., 1998] und Longibrachine [Leclerc et al., 2001] gegen Mycoplasmen.

Bei einer Reihe von Peptaibolen wie dem Alamethicin [Das et al., 1985], Hypelcin [Fujita et al., 1994], Antiamoebin [Das et al., 1986] und Zervamicin [Nagaraj et al., 2001] wurde festgestellt, dass sie die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien entkoppeln. Weil der Stofftransport in und aus den Mitochondrien *via* Membran wesentlich für deren Arbeitsfähigkeit ist, beeinflussen membranaktive Stoffe, wie die Peptaibole, diese Funktion [Nagaraj et al., 2001].

Auch die im Falle von Antiamoebin, Zervamicin und Efrapetin festgestellte Aktivität gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* beruht auf einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung [Nagaraj et al., 2001].

Alamethicin, Trichosporin und Trichokonin I-VII induzieren die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Catecholaminausschüttung [Aralejo et al., 1990; Fonteriz et al., 1991; Nagaoka et al., 1996; Iida et al., 1994]. Auch diese Aktivität wird vermutlich durch die Membranaktivität der Substanzen hervorgerufen.

Alamethicin, Suzukacillin, Trichotoxin und Stilboflavin führen zur Hämolyse bei Erythrozyten [Irmscher, Jung, 1977; Jaworski et al., 2001].

Weitere Eigenschaften, die auf die Membranaktivität der Peptaibole zurückzuführen sind, ist die Wirkung auf Pflanzen und Pilze. So sind Alamethicin, Chrysospermin, Ampullosporin und Bergofungin Elicitoren von Verteidigungsmechanismen von Pflanzen und regen die Rankenkrümmung an [Engelberth, 2001, 2000].



Darüber hinaus induzieren Chrysospermin und Ampullosporin die vorzeitige Pigmentbildung bei dem Pilz *Phoma destructiva* an [Schlegel, 2000].

Für einzelne Peptaibole sind eine Reihe weitere Wirkungen beschrieben. So wirken die Atroviridine *in vitro* cytotoxisch gegen humane Krebszelllinien [Oh et al., 2002], die Peptaivirine A und B verhindern die Infektion mit dem Tabakmosaikvirus [Yun et al., 2000]. Die Cephaibole wirken anthelmitisch gegen Ectoparasiten [Schiell et al., 2001]. Eine anthelmitische Wirkung ist auch schon für Antiamoebin [Thirumalachar et al., 1968] nachgewiesen worden.

Efrapeptin wirkt insektizid [Krasnoff et al., 1991 (a)]. Es handelt sich hierbei zwar nicht um ein Peptaibol im engeren Sinne; aber es weist einige peptaiboltypischen Strukturelemente wie den acetylierten N-Terminus, Aib-Reste und einen modifizierten C-Terminus (s. Abb1.2.2), auf.

Ac-Pip-Aib-Pip-Aib-Aib-Leu- $\beta$ -Ala-Gly-Aib-Aib-Pip-Aib-Gly-Leu-Aib-X

Pip: Pípecolinsäure                      x:

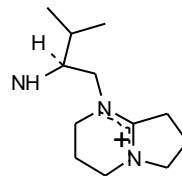


Abb.1.2.2: Sequenz des Efrapeptins C

Die meisten Wirkungen der Peptaibole auf biologische Testsysteme werden mit deren membranmodifizierenden Eigenschaften erklärt.

Eine Ausnahme bildet die Wirkung des Trichorzin HA V. Es bewirkt in Zellen, die Calcitonin bilden, eine Steigerung des cAMP-Spiegels. Dies lässt vermuten, dass hier ein Peptaibol als Agonist auf einen Rezeptor wirkt, also nicht seine membranmodifizierenden Eigenschaften im Vordergrund stehen [Katayama et al., 2001].

Aus der Literatur ist ersichtlich, dass unterschiedliche Peptaibole bisher nur in verschiedensten Testsystemen - unabhängig voneinander - untersucht worden sind, aber bisher noch keine vergleichenden Untersuchungen erfolgt sind.. Ein direkter Vergleich der biologischen Wirkungen verschiedener Peptaibole ist daher schwierig [Chugh, 2001].

## Membranmodifizierende Eigenschaften

Biomembranen sind die Abgrenzungen der beiden Systeme Umwelt- Zelle bzw. Zytosol- Organelle. Für sie gelten, wie für alle Systeme, die Gesetze der Thermodynamik [Ti Tien, 2000, S. 83ff].

Die Membran garantiert den kontrollierten Austausch von Stoffen und Energie zwischen diesen Systemen und ist damit von eminenter Bedeutung für das Leben.

Hauptbestandteile von Membranen sind Lipide und Proteine. Diese sind in einer bipolaren, beweglichen Doppelschicht organisiert.

Der Stofftransport durch die Membran kann aktiv unter Energieverbrauch oder passiv durch Diffusion entlang eines Gradienten erfolgen. Der passive Transport von Ionen erfolgt durch Kanäle („Channel mediated diffusion“), bei größeren Molekülen sorgen Carrier für die Diffusion durch die Membran („facilitated diffusion“). Beide Mechanismen werden von speziellen Membranproteinen gesteuert [Leistner & Breckle, 1992].

Peptaibole bilden helicale Strukturen aus. Dies ist unter anderem an durch den hohen Anteil an Aib, einer helixförmenden Aminosäure, bedingt. Hinzu kommt der amphipatische Charakter, mit einer lipophilen und einer hydrophilen Seite. Diese Charakteristika sind die Hauptgründe für die Membranaktivität der Peptaibole [Sansom, 1993; Shai, 1999].

Die Aktivität auf Biomembranen ist für die Forschung eine interessante Eigenschaft der Peptaibole, da die vielfältigen biologischen Aktivitäten auf dieses Phänomen zurückgeführt werden. Gleichzeitig stellen sie ein Modell für Ionenkanalbildner dar [Duclohier et al., 2001 (a)]

Die meisten Peptaibole, wie Alamethicin [Duclohier, 2001 (a)], Trichosporin [Nagaoka et al., 1996] und Trichotoxin [Chugh et al., 2002] formen spannungsabhängige Kanäle. Dagegen bildet das Chrysospermin salzgradienten-abhängige Kanäle [Grigoriev et al., 1995]. Anti-amoebin kann als Carrier die Membran überbrücken [Snook et al., 1998].

### 1.3. Schizophrenie

#### Rezeptoren

Bei der Schizophrenie handelt es sich um eine der schwerwiegendsten Erkrankung in der Psychiatrie. Der Terminus „Schizophrenie“ beschreibt ein komplexes multifaktorielles Krankheitsbild.

Neben genetischer Prädisposition liegen die Ursachen für die Erkrankung in Dysfunktionen verschiedener neuronaler Rezeptoren, und es gibt verschiedene Hypothesen, von denen keine allein gültig ist [Bondy, 2002].

Die beiden wichtigsten, die Dopamin- und die Glutamathypothese, werden hier kurz dargestellt.

Die Erstere beruht auf der Beobachtung, dass Neuroleptika antagonistisch auf den D<sub>2</sub>-Rezeptor wirken [Müller, 2002]. Dopamin selbst ist der hauptsächliche Neurotransmitter im Gehirn und als solcher an der Kontrolle zahlreicher Funktionen beteiligt. Das Postulat besagt, dass bei Schizophrenie die dopaminerge Neurotransmission im limbischen System des Gehirns überreagiert [Duncan, 1999].

Das zweite Modell, die Glutamathypothese, wurde zuerst von Kim et al. [1980] aufgestellt. Die Glutamatrezeptoren liegen in den Membranen. Sie werden in zwei Hauptgruppen unterteilt, die metabotropen Rezeptoren, die Änderungen in der Zelle bewirken, und die ionotropen Rezeptoren. Sie lösen Ionenflüsse und Änderungen des Membranpotenzials aus. Diese Gruppe wird in drei weitere Untereinheiten, die NMDA-, die AMPA- und die Kainat-Rezeptoren, aufgeteilt. Die beiden letzten sind spezifisch für einwertige Ionen, der NMDA-Rezeptor lässt unspezifischer Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> passieren. Zur Aktivierung des NMDA-Rezeptors sind die beiden Agonisten Glycin und Glutamat notwendig. Zusätzlich ist für die Öffnung des Ionenkanals noch eine Änderung der Ruhespannung, z. B. durch die anderen Rezeptoren, notwendig. Im Inneren des Kanals finden sich Bindungsstellen, an die Substanzen wie MK-801 und Ketamin binden und den Kanal blockieren können.

Kurz zusammengefasst kann man sagen, dass es zwischen dopaminerger und glutaminerger Neurotransmission ein Gleichgewicht gibt [Bleich et al., 2001].

Vor kurzem konnte erstmals ein Zusammenhang zwischen bestimmten Genen, z. B. dem G72 auf Chromosom 13q34 [Chumakov et al., 2002], das für den NMDA-Rezeptor codiert, und dem Auftreten von Schizophrenie festgestellt werden. Es kann aber nicht ein einzelnes Gen allein für den Ausbruch der Krankheit verantwortlich gemacht werden [Cloniger, 2002].

## Medikation

Die Therapie der Schizophrenie erfolgt durch die Gabe von Neuroleptika. Sie werden in zwei Hauptgruppen unterteilt.

Als sog. genannte klassischen Neuroleptika, sind vor allem Phenothiazinderivate wie Chlorpromazin und Butyrophenone, z. B. Haloperidol (s. Abb. 1.3.1) zu nennen. Sie wirken

als Antagonisten vor allem des D<sub>2</sub>-Rezeptors. Da aber neben dem D<sub>2</sub>-Rezeptor im mesolimbischen System, in dem die Symptome für die Schizophrenie ausgelöst werden, auch die Rezeptoren im Striatum blockiert werden, kommt es zu erheblichen Nebenwirkungen. Vom Striatum werden die extrapyramidal-motorischen Bewegungen gesteuert. So kommt es zu „extrapyramidalen Störungen“ (EPS). Sie äußern sich durch Dyskinesie und medikamentöses Parkinsonoid.

Daneben haben sich die „atypischen“ Neuroleptika etabliert, hier vor allem das Clozapin, außerdem sei noch das Risperidon genannt (s. Abb. 1.3.1). Sie zeigen bei deutlich geringeren EPS eine bessere Wirksamkeit auch auf die sog. Negativsymptome. Das ist zunächst erstaunlich, da auch sie Antagonisten des D<sub>2</sub>-Rezeptors sind. Aber anders als die typischen Neuroleptika wirken sie auch auf weitere Rezeptoren wie den M-, den D<sub>1</sub>-, den D<sub>4</sub>-, den  $\alpha_1$ - und insbesondere auf den 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor. Durch den 5-HT<sub>2A</sub>-Antagonismus wird eine serotonerge Hemmung, die als spezifisch für nigrostriatale dopaminerge Neurone gilt, aufgehoben. Als Konsequenz ist dieses System weniger blockiert, und die EPS sind deutlich schwächer ausgeprägt [Müller, 2002].

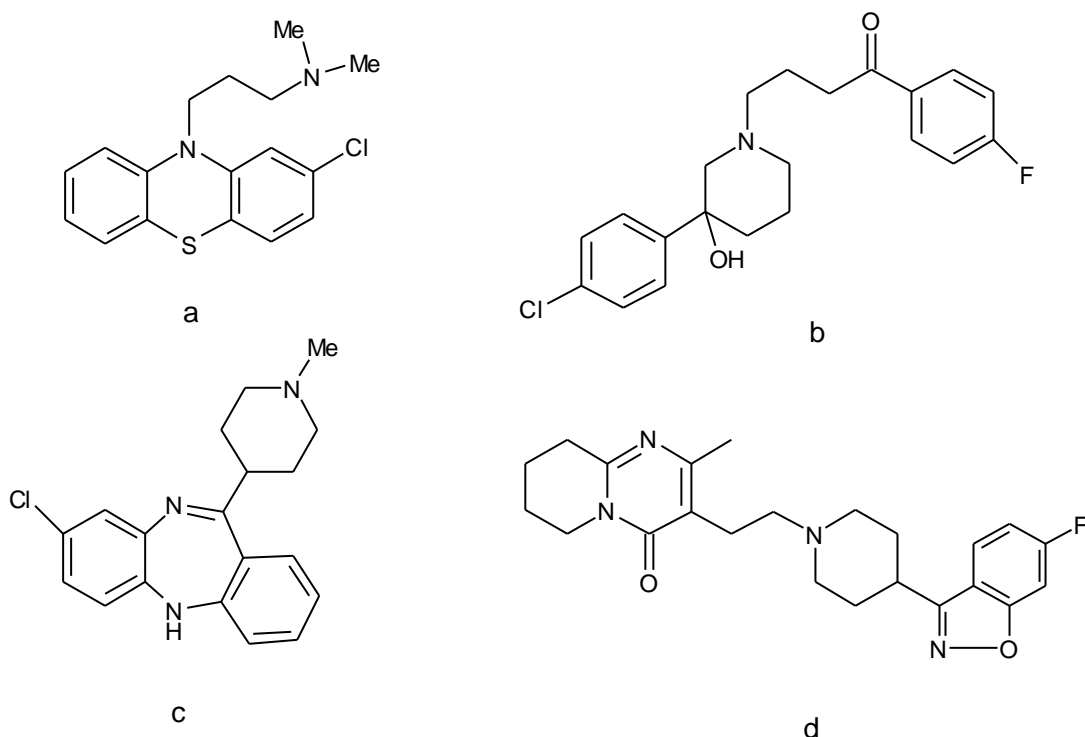


Abb. 1.3.1.: Strukturformeln einiger Neuroleptika. a: Chlorpromazin, b: Haloperidol, c: Clozapin und d: Risperidon

## 1.4. Ampullosporin

### Struktur

Das Peptaibol Ampullosporin wurde 1997 von Ritzau et al. beschrieben. Die Sequenz besteht aus 15 Aminosäuren, davon allein sieben Aib-Reste. Am N-Terminus befindet sich die aromatische Aminosäure Tryptophan. Auffällig ist auch das Fehlen von Prolin oder Hydroxyprolin, zwei für Peptaibole typische Aminosäuren [Chugh et al., 2001].

Ac-L-Trp<sup>1</sup>-L-Ala<sup>2</sup>-Aib<sup>3</sup>-Aib<sup>4</sup>-L-Leu<sup>5</sup>-Aib<sup>6</sup>-L-Gln<sup>7</sup>-Aib<sup>8</sup>-Aib<sup>9</sup>-Aib<sup>10</sup>-L-Gln<sup>11</sup>-L-Leu<sup>12</sup>-Aib<sup>13</sup>-L-Gln<sup>14</sup>-L-Leuol<sup>15</sup>

Nach den oben erwähnten Systemen zur Klassifizierung von Peptaibolen gehört es zu den kurzen Peptaibolen [Fujita et al., 1994], bzw. zur Unterfamilie 6 [Chugh et al., 2001].

### Produzent

Ampullosporin wird aus dem Mykoparasiten *Sepedonium ampullosporum* HKI053 gewonnen [Ritzau et al., 1997], der zur Familie der Hypocreaceae, Klasse Hypocreales [Ammer et al., 1997] gehört. Die deutsche Bezeichnung für den Produzenten ist Goldschimmel [Dörfelt & Jetschke, 2001]. Sowohl der deutsche als auch der lateinische Name beziehen sich auf das Aussehen der Sporen. Die Phialosporen erscheinen unter dem Mikroskop ampullenförmig, die Aleuriosporen leuchten, makroskopisch sichtbar, gelb-orange (s Abb. 1.4.1) [Reiber, 2003]. Die bisher beschriebenen Species der Gattung parasitieren auf Makromyceten, besonders der Ordnung Boletales [Ammer et al., 1997].

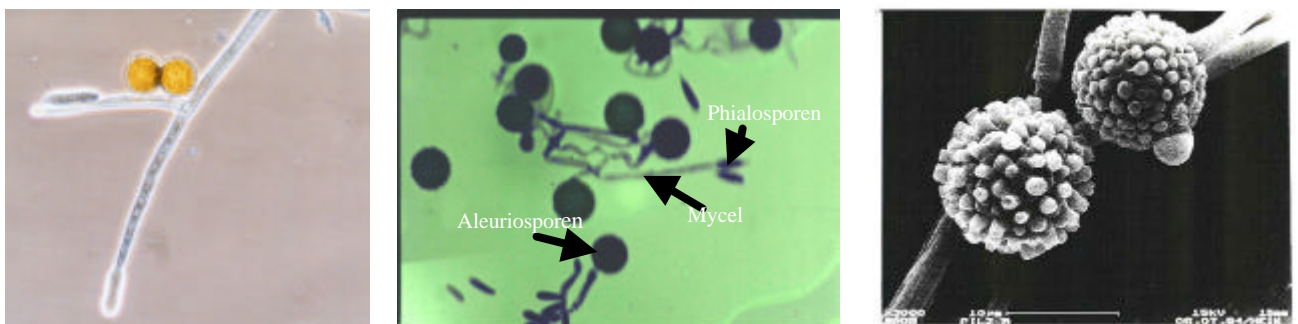


Abb. 1.4.1: links: orangefarbene Aleuriospore, Mitte: mikroskopische Aufnahme der verschiedenen Sporen von *S. ampullosporum*, rechts: Aleuriosporen unter dem Rasterelektronenmikroskop.

## Biologische Aktivität von Ampullosporin

Als typisches Peptaibol hat Ampullosporin antibiotische Eigenschaften. So wirkt es gegen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und gegen Pilze [Ritzau et al., 1997].

Ampullosporin induziert die Pigmentbildung des Pilzes *Phoma destructiva* [Ritzau et al., 1997].

Die Morphogenese von Mikroorganismen ist ein komplexer Vorgang, der durch Signalmoleküle reguliert wird. Sekundärmetabolite können diese Regulation beeinflussen. Die Suche nach solchen Stoffen ist ein vielversprechender Weg zum Auffinden neuer Regulatoren der Cytodifferenzierung und neuer Leitstrukturen [v. Döhren & Gräfe, 1997].

Das bisher bekannteste Beispiel ist das Pamamycin, das beim eigenen Produzenten *Streptomyces alboniger* die Bildung eines Luftmycels hervorruft [McCann, 1979, Natsuma, 1999].

Bei Pilzen sind außer dem hier genannten bisher wenige Beispiele für eine Cytodifferenzierung durch Sekundärmetabolite beschrieben. Als Beispiel sei *Aspergillus niger* genannt, der auf Immunsuppressiva wie Cyclosporin und FK506 reagiert [Sakamoto, 1995].

Weitere Induktoren auf *Phoma destructiva* sind Cyclosporin und Chrysospermin [Dornberger et al., 1995]. Darüber hinaus induzieren auch in der Klinik eingesetzte Neuroleptika, wie Chlorpromazin, Haloperidol, Clozapin und Sertindol, die Cytodifferenzierung in diesem Stamm. Der „Phomatest“ kann damit als Vorscreening für neuroleptische wirksame Substanzen eingesetzt werden [Schlegel et al., 2000].

Aufgrund dieses positiven Phomatests wurde Ampullosporin A auf seine Aktivität als Neuroleptikum getestet. Es wurde festgestellt, dass Ampullosporin A die Körpertemperatur bei Mäusen herabsetzt [Ritzau et al., 1997]. Dies ist eine typische Nebenwirkung von Neuroleptika und dient als Nachweis von neuroleptischer Aktivität [Yehuda, 1977; Heh et al., 1988; Oerther et al., 2000].

Bei den Tieren konnten außerdem noch Veränderungen im Bewegungsverhalten beobachtet werden, die als typische Nebenwirkungen von Neuroleptika bekannt sind.

Endgültig wurde die neuroleptische Aktivität des Ampullosporins mit einem Verhaltenstest nachgewiesen. Dabei wurde die Veränderung im Verhalten Ratten, die auf bestimmte

Reaktionen konditioniert waren, untersucht. Das Ausbleiben der Reaktionen bei einer Ampullosporingabe unterhalb der Katalepsie erbrachte den Nachweis, dass es als atypisches Neuroleptikum wirkt [Härtl et al., 1999].

Wie oben erwähnt, sind viele Peptaibole membranaktiv, so auch Ampullosporin. Es bildet spannungsabhängige („gated“) Ionenkanäle an artifiziellen Bilayer-Lipid-Membranen aus. Diese Kanäle sind spezifisch für  $K^+$ -Ionen, für andere Kationen ist die BLM sehr viel weniger bzw. gar nicht durchlässig (s.Abb. 1.4.2) [Grigoriev et al., 1997]

Die Aktivität ist konzentrationsabhängig und liegt in einem Bereich von 300 – 500 nM. Bei höheren Konzentrationen wird die Membran instabil. Der Konzentrationsbereich entspricht dem für das 16mer Antiamoebin beschriebenen [Snook et al., 1998; Menestrina et al., 1986] und liegt weit über dem des Alamethicins, das schon bei einer Konzentration von 0,05  $\mu\text{g} / \text{mL}$  (= 0,05nM) Poren in Membranen bildet [Menestrina et al., 1986].

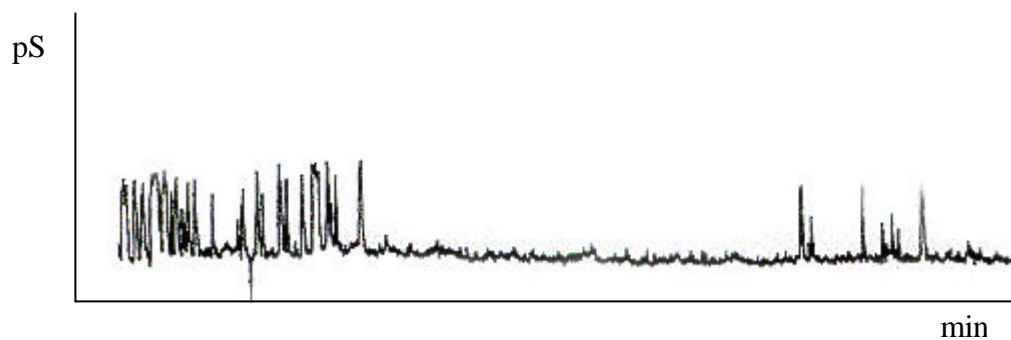


Abb. 1.4.2: Aufnahmen einer Membranmessung von Ampullosporin, der Anstieg der Leitfähigkeit zeigt die Bildung einer Pore an. aus Grigoriev, 1997

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, Struktur-Wirkungsbeziehung des Ampullosporins im Hinblick auf die Pigmentinduktion bei *Phoma destructiva* und die neuroleptische Wirkung an Mäusen (Hypothermie) herauszuarbeiten. Dies erforderte den Einsatz von natürlichen und chemisch modifizierten Analoga des Ampullosporins sowie Untersuchungen zur Raumstruktur. Dafür wurden mehrere Strategien gewählt:

1. Zunächst sollte der Bildner *Sepedonium ampullosporum* auf natürliche Homologe und Isomere des Ampullosporins A untersucht werden.  
Dafür war eine geeignete Trennmethode auf der Basis der HPLC zu entwickeln. Zur Strukturaufklärung der isolierten Metabolite sollten die unterschiedlichen Methoden der Massenspektrometrie und der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektroskopie eingesetzt werden.
2. Der Produzent sollte durch die Fütterung geeigneter Vorläufer („gerichtete Biosynthese“) angeregt werden, weitere Ampullosporinanaloga zu synthetisieren.
3. Da bisher keine Daten zur Konformation des Ampullosporins A vorlagen, war eine Kristallisationsmethode zu entwickeln, um die 3-D-Struktur mit Hilfe der Röntgenkristall-Strukturanalyse aufklären zu können.
4. Die für die Ausbildung der Konformation wichtigen funktionellen Gruppen (s. Kristallstruktur) sollten gezielt chemisch modifiziert werden.
5. Änderungen der Konformation natürlicher und partialsynthetischer Ampullosporinanaloga im Vergleich zum Ampullosporin A waren mit Hilfe des Circular-Dichroismus zu untersuchen.
6. Die biologischen Wirkungen der natürlichen und partialsynthetischen Ampullosporinanaloga sollten untersucht und mit Ampullosporin A verglichen werden, wobei als Testsysteme der Zelldifferenzierungsassay mit *Phoma destructiva* und die Messung der Körpertemperatur bei Mäusen herangezogen werden sollten.
7. Mit Hilfe der „voltage clamp“-Methode sollten die Membranaktivitäten der Substanzen bestimmt, und die strukturellen Parameter und biologischen Aktivitätsdaten mit der Membranaktivität korreliert werden.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Liste der verwendeten Chemikalien und Geräte

Acetanhydrid	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Aceton	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Acetonitril	Fisher Chemicals, Loughborough, UK
Agarose	ROTH, Karlsruhe
$\alpha$ -Aminoisobuttersäure	FLUKA, Steinheim
Ammoniumhydrogenphosphat	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Ammoniumsulfat	Altbestand
Calciumcarbonat	Altbestand
Chloroform	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Chymotrypsin	SIGMA, Deisenhofen
D,L-Isovalin	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
D,L-Phenylalanin	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
D,L-Valin	SERVA Feinbiochemica, Heidelberg
D-Alanin	Nutrional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, USA
d-Camphersulfonsäure	SIGMA, Deisenhofen
D-Glutamin	Nutrional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, USA
Dichlormethan	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Dicyclohexylcarbodiimid	FLUKA, Steinheim
Dimethoxyethan	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Dimethylaminopyridin	FLUKA, Steinheim
Dimethylsulfoxid	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
D-Leucin	Nutrional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, USA
D-Tryptophan	Nutrional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio, USA
Eisessig	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Ethylacetat	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Ethanol	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt

5-Fluoro-Tryptophan	FLUKA, Steinheim
Glucose	ROTH, Karlsruhe
Glycerol	ROTH, Karlsruhe
Hefeextrakt	OXOID, Wesel
5-Hydroxy-Tryptophan	FLUKA, Steinheim
Iodomethan	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Kaliumchlorid	ACROS ORGANICS, Geel, Belgien
Kaliumdihydrogenphosphat	Altbestand
Kieselgel (0,04 - 0,06 µm)	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Kieselgel (0,06-1 µm)	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
L-Alanin	FLUKA, Steinheim
L-Asparagin	FLUKA, Steinheim
L-Glutamin	FLUKA, Steinheim
L-Leucin	FLUKA, Steinheim
L-Tryptophan	FLUKA, Steinheim
L-Tyrosin	FLUKA, Steinheim
Magnesiumsulfat*7H <sub>2</sub> O	ACROS ORGANICS, Geel, Belgien
Maltose	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Malzextrakt	OXOID, Wesel
Marfey's Reagenz	FLUKA, Steinheim
Methanol	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Natriumchlorid	FLUKA, Steinheim
Natriumdodecylsulfat	SIGMA, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat	ROTH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	ROTH, Karlsruhe
Natriumnitrit	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Natriumsulfat	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
N-Bromsuccinimid	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
n-Butanol	ROTH, Karlsruhe
n-Heptan	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
o-Phosphorsäure (85 %)	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Pepsin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Pepton	Altbestand (Tryptisches Pepton aus Casein)
Petrolether	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt

Phosphatidylcholin	SIGMA, Deisenhofen
Pronase	Boehringer Mannheim, Mannheim
Pronase	Boehringer Mannheim, Mannheim
Pyridin	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Salzsäure	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Sephadex LH20	AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH AB, Uppsala, Schweden
Silberoxid	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Triacetylglucal	Altbestand
Triethylamin	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Trifluoressigsäure	MERCK EUROLAB GmbH Darmstadt
Trifluorethanol	FLUKA, Steinheim
Triphenylphosphoniumbromid	ACROS ORGANICS, GEEL, Belgien
Tween 80	SIGMA, Deisenhofen
Zinksulfat*7H <sub>2</sub> O	Altbestand

#### Geräte:

##### HPLC-Anlagen

HPLC 1:	Shimadzu, Kyoto, Japan
Autosampler:	SIL-10 ADvp
2 Pumpen:	LC-10 Atvp
Degasser:	DGU-14 A
Detektor:	SPD M 10Avp
System-Controller:	SCL-10 Avp
Software:	Class VP 5.03
Säule:	GROM, Herrenberg-Kay Nucleosil 100 C <sub>18</sub> , 5µm, 125 x 3,0
Gradient:	1 min 99,5 % 0,1 %ige TFA-Lösung, 0,5 % MeCN 16 min 0,5 % 0,1 %ige TFA-Lösung, 99,5 % MeCN 17 min 0,5 % 0,1 %ige TFA-Lösung, 99,5 % MeCN 22 min 99,5 % 0,1 %ige TFA-Lösung, 0,5 % MeCN
Flußrate:	2 mL / min

HPLC 2:	Shimadzu, Kyoto, Japan
2 Pumpen:	LC-10AT
Degasser:	GT-104
Detektor:	DAD SPD M10A
System-Controller:	CBM 10A
Software:	CLASS LC10
Säule:	a) analytisch: GROM, Herrenberg-Kayn Nucleosil 100 C <sub>18</sub> , 5µm, 125 x 4,6 mm b) präparativ: GROM, Herrenberg-Kayn
Gradient:	1 min 99,5 % 0,1 %ige TFA-Lösung, 0,5 % MeCN 16 min 0,5 % 0,1 %ige TFA-Lösung, 99,5 % MeCN 17 min 0,5 % 0,1 %ige TFA-Lösung, 99,5 % MeCN 22 min 99,5 % 0,1 %ige TFA-Lösung, 0,5 % MeCN
Flußrate a:	2 mL / min
Flußrate b:	5 mL / min
HPLC 3:	Gilson Abimed Analysen Technik GmbH, Langenfeld
Pumpe a:	305 pump
Pumpe b:	306 pump
Manometer:	805 manometric module
Detektor:	118 UV/VIS detector
Software:	UniPoint
Säule:	a) Grom, Herrenberg-Kayn, SIL 100 ODS 5 µm 250 x 4 mm b) MN, Düren, Nucleosil 100 C <sub>18</sub> , 5µm 25 cm x 21,2 mm
Heizblock:	thermo DUX Gesellschaft f. Laborgeräte mbH, Wertheim Techne DB 3
CD-Spectrometer:	JASCO, Umstadt Model 720
Schmelzpunktbestimmung:	Büchi, B-540, Büchi AG, Schweiz

### 3.2. Allgemeine Nachweismethoden auf Ampullosporin

#### 3.2.1. Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Ampullosporin

Geräte

Dünnschichtkammer

DC-Platten

UV-Lichtquelle (256 nm)

Chemikalien

Ampullosporin-Standard:

1 mg / mL MeOH

Laufmittel:

n-BuOH / Wasser / MeCN

4 / 2 / 1

Sprühereagenz:

1 g NaNO<sub>2</sub> auf 100 mL 1M HCl

Es wurden ausreichende Mengen der zu prüfenden Lösungen aufgetragen. Parallel dazu wurde der Ampullosporin-Standard aufgetragen. Dann wurden die DC-Platten entwickelt. Die Detektion erfolgte anhand der UV-Löschung und der Rotfärbung durch das Sprühereagenz.

#### 3.2.2. HPLC

Der Nachweis mittels HPLC erfolgte an den HPLC-Anlagen 1 und 2 anhand der Retentionszeiten.

Quantitative Bestimmung

Chemikalien:

Stammlösung von Ampullosporin 1 mg / mL in MeOH

Geräte:

HPLC 1

Die quantitative Bestimmung von Ampullosporin und seinen Homologen und Derivaten wurde mittels HPLC durchgeführt. Dafür wurden aus der Stammlösung je 3 Lösungen mit

den Konzentrationen 500 µg /mL, 200 µg / mL, 100 µg / mL, 50 µg / mL, 40 µg / mL und 20µg / mL hergestellt. Die Kalibration erfolgte mit der HPLC-Software. Für die Kalibration wurden die Wellenlängen bei 210 nm (Absorption der Amidbindung im Peptid) und 280 nm (Absorption des Indolringes), verwendet. Die Kalibration wurde regelmäßig überprüft und gegebenenfalls erneuert. Als Referenz diente die Retentionszeit des Ampullosporins.

### 3.3. Fermentation von Ampullosporin

#### Peptonmedium, Flüssig

Glycerin	5 ( - 30) g/L
Glucose	30 (- 15) g/L
Pepton	5 g/L
NaCl	2 g/L
Agar	1 g/L

#### Pepton-Agarmedium

Glycerin	5 ( - 30) g/L
Glucose	30 (- 15) g/L
Pepton	5 g/L
NaCl	2 g/L
Agar	15 g/L

pH 7,0; (vor der Sterilisation im Autoklaven auf 7,5 einstellen)

#### 3.3.1. Oberflächenkultivierung

In Petrischalen wurden ca 20 mL verflüssigtes Agarmedium gefüllt. Nach Abkühlen und Erstarren des Mediums wurde mit einem Agarstückchen aus einer Vorkultur von *S. ampullosporum* überimpft. Die Kultivierung erfolgte über zwei bis vier Wochen bei 24 °C.

#### 3.3.2. Emerskultivierung

Die Anzucht von *S. ampullosporum* erfolgte durch Beimpfen von 100 mL Flüssigmedium in 500 mL-Erlenmeyerkolben mit den unter 3.3.1. beschriebenen Vorkulturen. Die Standkulturen wurden zwei bis drei Wochen bei 24°C bebrütet.

#### 3.3.3. Submerskultivierung

Die Inokulation erfolgte wie unter 3.3.2. beschrieben. Die Schüttelkultur wurde zwei bis drei Wochen bei 24 °C und 110 U/min kultiviert.

#### 3.3.4. Festbettkultivierung

*S. ampullosporum* wurde auf einem Getreidemix kultiviert. Diese Fermentation erfolgte in Kooperation mit der Firma PROPHYTA GmbH. Das genaue Fermentationsverfahren kann

deshalb hier nicht dargestellt werden. Prinzipiell wird der Organismus auf in dünnen Schichten aufgeschüttetes, feuchtes und keimarmes Substrat aufgebracht. Danach wird zwei bis drei Wochen ohne Aufmischung des Substrats fermentiert. Dann hat das Pilzmycel das Medium völlig durchwachsen, und in dem Falle von *S. ampullosporum* färbte sich das Substrat aufgrund der in den Aleuriosporen akkumulierten Anthrachinone leuchtend gelb.

### **3.4. Extraktion des Ampullosporins aus den Fermentationsmassen**

Die Extraktion erfolgte jeweils aus den gesamten Ansätzen.

Bei der Oberflächen-Fermentation wurde der Pilz mit dem Agar in Bechergläser überführt zerkleinert und mit Essigester überschichtet. Unter ständigem Rühren wurde einige Stunden extrahiert, abfiltriert und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet.

Die Emers- bzw Submerskultivierungsansätze wurden mit Essigester versetzt und einige Stunden gerührt. Dann wurde die wässrige Phase im Scheidetrichter abgetrennt und verworfen. Die organische Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet.

Auch die Festbett-Fermentation wurde mehrere Stunden mit Essigester extrahiert, die organische Phase abgetrennt und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet.

### **3.5. Aufreinigung des Ampullosporins**

Die Extrakte wurden im Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in Petrolether aufgenommen und lipophile Bestandteile wurden durch Fällung abgetrennt. Zurück blieb ein gelb gefärbter Rückstand.

Die weitere Aufreinigung und Isolierung erfolgte über eine Kieselgelsäule. Es wurde mit einem Gradienten beginnend 100 % Chloroform, dann 95 / 5, 90 / 10, 80 / 20 und von 70 / 30 (v / v Chloroform / Methanol) eluiert und man erhielt ein fast chromatographisch reines Produkt, dass aber noch gelblich gefärbt war.

Deshalb wurden weitere Reinigungsschritte angeschlossen. Zunächst wurde das Rohampullosporin über eine Sephadex-LH-20-Säule aufgrund seiner Molekülgröße von kleineren Begleitstoffen mit Methanol als Elutionsmittel abgetrennt.

Daran schloß sich eine isokratische präparative HPLC (HPLC 3b) an. Die Elution erfolgte mit einem Gemisch von MeCN /  $\text{H}_2\text{O}$  von 70 / 30 (v / v) bei einer Flußrate von 20 mL / min.

Zuletzt wurde das Ampullosporin aus MeCN umkristallisiert. Es wurde in heißem MeCN gelöst. Aus der Lösung fiel beim Abkühlen weißes, halbkristallines Ampullosporin aus.

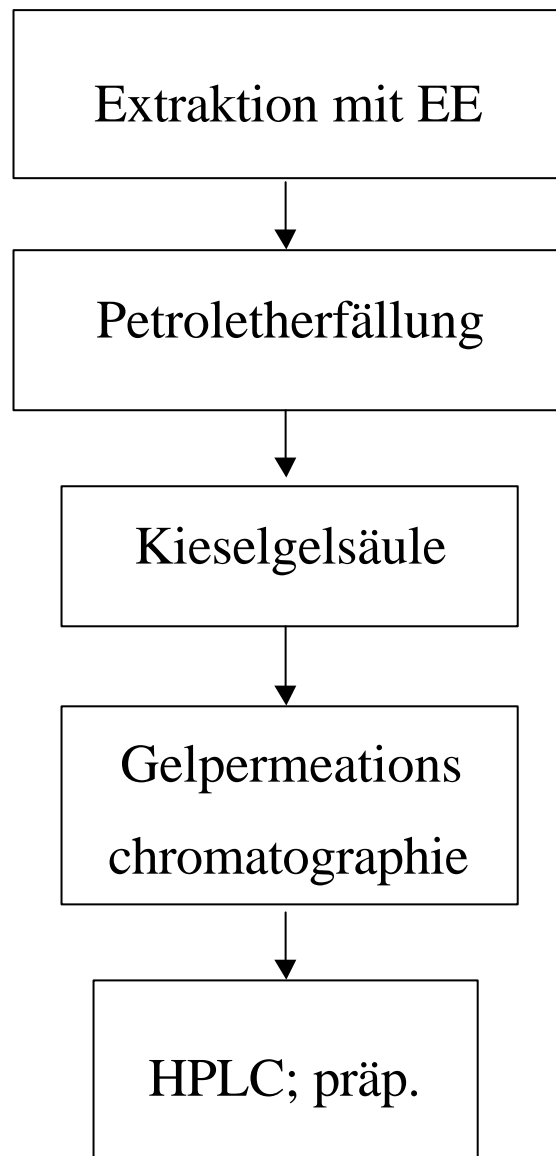


Abb.3.5.1.: Aufreinigungsschema von Fermentationsansätzen von *S. ampullosporum*

### 3.6. Isolierung von natürlich vorkommenden Ampullosporin-Homologen

Der unter 3.5. gewonnene Ampullosporinkomplex wurde noch einmal über eine präparative HPLC (HPLC 3b) aufgetrennt.

Die Bedingungen wurden nur leicht variiert. Die Elution erfolgte ebenfalls isokratisch mit 40 mL/min, bei einem Acetonitril / Wasser -Verhältnis von 6/4.



### 3.7. Strukturaufklärung der neuen Ampullosporine

Die Strukturaufklärung wurde mit Hilfe der verschiedenen Methoden der Massenspektrometrie und der NMR-Spektroskopie durchgeführt. Die Bestimmung der Konfiguration der Aminosäuren erfolgte mittels analytischer HPLC nach Derivatisierung des Hydrolysats mit Marfey's Reagenz.

#### 3.7.1. Massenspektrometrie

1. FAB: Hochauflösendes doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer AMD 402 mit Direkteinlaßsystem, Ionisierspannung: 70 eV (AMD Intectra Harpstedt) FAB-Matrix: 3-Nitrobenzylalkohol, Cs-Ionenbeschuß
2. ESI-Triple-Quadrupol-Messungen: VG Quattro mit ESI-Quelle (VG Biotech Altrincham, England), Eluent MeOH/H<sub>2</sub>O = 99 : 1; Flußrate: 15 µl/min, Temperatur 65 °C. Stoßgas für CID-MS/MS-Untersuchungen: Argon.
3. ESI-Ion-Trap-Messungen: Benchtop-Massenspektrometer Finnigan LCQ (Finnigan Bremen). Stoßgas für MS<sup>n</sup>-Messungen: Helium.
4. HRESI-MS: Hochauflösendes doppelfokussierendes Sektorfeld-Massenspektrometer Finnigan MAT 95XL (Finnigan Bremen).

Zunächst wurden die Komponenten in ESI-MS sowohl im positiven als auch im negativen Modus vermessen. Damit konnten aus den Quasimolekülonen die Molmassen der einzelnen Ampullosporine bestimmt werden.

Zur Sequenzbestimmung aus der Genealogie der Fragmente wurden ESI-Tandem-MS und MS<sup>n</sup>-Spektren aufgenommen.

Für die Bestimmung der Fragmente im niedermolekularen Bereich wurden FAB-Spektren aufgenommen.

Die Präzisionsmessungen erfolgten mittels HRESI-MS.

### 3.7.2. Kernresonanzspektroskopie

Zur Absicherung der aus der Massenspektroskopie gewonnenen Daten wurden von den Ampullosporinen B-D ein- und, sofern möglich, zweidimensionale NMR-Spektren aufgenommen. Dazu wurden die Proben in deuteriertem DMSO gelöst.

Die Messungen erfolgten am NMR-Spektrometer Avance DRX 50 (Bruker, 500MHz).

### 3.7.3. Chiralitätsbestimmung [Kochar et al., 2000]

Da bis auf die Aib alle in den Ampullosporinen enthaltenen Aminosäuren chiral sind, wurde die Konfiguration bestimmt.

Die Bestimmung erfolgt nach der Hydrolyse der Peptide durch Vorsäulenderivatisierung mit Marfey's Reagenz und anschließender analytischer HPLC.

#### Hydrolyse

##### Chemikalien:

HCL 1M und 0,1 M

Argon

##### Geräte:

Thermoblock

Je 1 mg der Ampullosporine B-E wurden in Hydrolyseröhrchen mit 1 mL 1M HCl versetzt. Anschließend wurde der Luftsauerstoff durch dreimaliges Evakuieren und Begasen mit Argon vertrieben. Die Hydrolysen erfolgten in einem Thermoblock bei 120 °C für 24 h. Nach dem Abkühlen wurde die Salzsäure *in vacuo* abdestilliert. Zur vollständigen Abtrennung der HCl wurden die Rückstände je zweimal in je 1 mL Aqua bidest. aufgenommen und jeweils bis zur Trockene eingengt und schließlich in 1 mL 0,1 M HCl gelöst.

Derivatisierung mit 1-Fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamid (Marfey's Reagenz)

##### Chemikalien:

Marfey's Reagenz: 1 g / 100 mL Aceton

NaHCO<sub>3</sub>: 0,5 M

DMSO: 50 %ig

HCl: 2 M

Standardaminosäurelösungen: je 1mg der D,L-Aminosäuren in 1 mL MeOH

Triethylamoniumphosphatpuffer, pH 3 (6,93 mL Triethylamin, 950 mL Wasser mit 85 %iger ortho-Phosphorsäure auf pH 3 einstellen auf 1 L auffüllen)

Eluent A: Triethylamoniumphosphatpuffer, pH 3 / MeCN, 9 / 1 v / v

Eluent B: Triethylamoniumphosphatpuffer, pH 3 / MeCN, 5 / 5 v / v

Ein je ca 2  $\mu\text{mol}$  Aminosäure enthaltendes Volumen der Proben bzw. des Standards wurde *in vacuo* zur Trockene eingeeengt, mit 40  $\mu\text{L}$  der  $\text{NaHCO}_3$ - Lösung vermischt und mit 80  $\mu\text{L}$  der Marfey's-Lösung versetzt.

Die Lösung wurde 1 h bei 40 °C im Thermoblock erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 10  $\mu\text{L}$  HCl zugegeben und mit 2,37 mL der DMSO-Lösung auf 2,5 mL Meßlösungen aufgefüllt.

HPLC Parameter:

Flußrate: 1 mL / min

Detektionswellenlänge: 350 nm

Gradient:

t (min)	0	12	24	45	50
Konz B (%)	0	40	50	100	0

Die Zuordnung erfolgte anhand der Retentionszeiten der Standards.

### 3.8. Bestimmung des Drehwertes

Die Drehwerte wurden an einem Propol Polarimeter der Firma Dr. Kernchen in methanolischer Lösung vermessen.

### 3.9. Bestimmung der Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit der Schmelzpunktapparatur Büchi B-506 bestimmt.

### 3.10. Vorläuferorientierte Biosynthese

#### 3.10.1 Ermittlung eines optimalen sythetischen Mediums

Agarmedien:

##### Variante 16:

Glucose	10 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,008 g/L

##### Variante 24:

Maltose	10 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L

##### Variante 26:

Maltose	20 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,008 g/L

##### Variante 17:

Glucose	10 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,008 g/L
CaCO <sub>3</sub>	5,1 g/L

##### Variante 25:

Maltose	10 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
CaCO <sub>3</sub>	5,1 g/L

##### Variante 27:

Maltose	20 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,5 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,008 g/L
CaCO <sub>3</sub>	5,1 g/L

alle Varianten mit 1,5 % Agar

Um ein optimales Produktionsmedium zu finden, wurde *S. ampullosporum* zunächst für 14 Tage auf den oben angegebenen Medien in Petrischalen kultiviert. Dann wurde das Wachstum des Produzenten anhand von Mycelbildung und -farbe bewertet. Anschließend wurde die Kultur mit Ethylacetat extrahiert. Der getrocknete Extrakt wurde dann in 1 mg/mL MeOH gelöst, filtriert und zur quantitativen Bestimmung des Ampullosporingehaltes mittels analytischer HPLC untersucht.

### 3.10.2. Fütterung der Aminosäuren

Es wurden die Medien 16 und 24 verwendet, dabei wurde je einmal die Aminosäure als einzige Stickstoffquelle oder  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  als weitere Stickstoffquelle neben der zu prüfenden Aminosäure zugesetzt.. Die Aminosäuren wurden als steriltrifizierte Lösungen in einer Konzentration von 1 mg / 20 mL dem Agar vor der Beimpfung mit *S. ampullosporum* zugegeben. Nach zweiwöchiger Inkubation wurde extrahiert und der Extrakt *in vacuo* zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde quantitativ auf den Gehalt von Ampullosporin in der analytischen HPLC untersucht. Der Nachweis auf den Einbau ampullosporinfremder Aminosäuren oder veränderte Verhältnisse der im Peptaibol vorkommenden Aminosäuren wurde mit ESI-MS anhand der berechneten Masseunterschiede zum natürlichen Ampullosporin geführt.

## 3.11. Derivatisierung des Ampullosporins A

### 3.11.1. Abspaltung des Tryptophans durch N-Bromsuccinimid [Witkop, 1968]

#### Chemikalien:

N-Bromsuccinimid

Chloroform (redestilliert, d.h. mit Spuren von Wasser)

200 mg Ampullosporin wurde in redestilliertem Chloroform suspendiert. Zu der Suspension wurden 6,8 mg NBS (3facher molarer Überschuß) gegeben und 1h bei Raumtemperatur gerührt. Nachdem die Reaktionslösung zur Trockene eingedampft war, wurde der Rückstand in MeOH gelöst und über eine LH20-Säule gereinigt.

Nach der Aufreinigung wurden 19,2 mg Desacetyltryptophanyl-Ampullosporin erhalten. Das entspricht einer Ausbeute von ca. 20 %.

### 3.11.2.Methylierung der Glutaminseitenketten [Meerwein , 1965]

#### Chemikalien:

200 mg Amp A

500 mg  $\text{Ag}_2\text{O}$

#### Geräte:

HPLC 2b

200 µL CH<sub>3</sub>I

Dimethoxyethan (trocken)

DMSO

Chloroform

Methanol

Kieselgel (0,04-0,06µm)

Das Ampullosporin wurde in Dimethoxyethan suspendiert und mit einem Tropfen DMSO in Lösung gebracht, dann wurde das Silber-(II)-oxid zugegeben und 1 h gerührt. In diese Lösung wurde das Methyljodid langsam zugetropft und über Nacht gerührt. Abschließend wurde die Reaktionslösung unter Rückflußkühlung 2h zum Sieden erhitzt.

Der Niederschlag wurde abflitriert, und man erhielt eine hellgelbe Lösung, die zur Trockene eingengt wurde. Die Reinigung erfolgte über präparative HPLC.

Das sechsfach methylierte Produkt konnte in einer Ausbeute von 3 % (8 mg) gewonnen werden.

### 3.11.3. Reaktionen am C-Terminus

#### 3.11.3.1. Acetylierung mit Acetanhydrid [Naoki, 1995; Fieser, 1980]

##### Chemikalien:

Acetanhydrid

Pyridin

Chloroform

DCC

DMAP

##### Geräte:

HPLC 2b

Es wurden 50 mg Ampullosporin A und 0,3 ml Acetanhydrid in 1 ml Pyridin gelöst und über 24 h bei RT gerührt. Zur Zerstörung des überschüssigen Acetanhydrids wurde die Reaktionslösung mit 10 ml Wasser versetzt. Anschließend wurde dreimal mit Chloroform ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt und *in vacuo* zur Trockene eingengt. Nach Vorreinigung über eine Sephadex LH-20 Säule wurde mittels HPLC das reine Produkt gewonnen. Ausbeute: 32,6 mg (65 %).

Alternativ wurde mit Dicyclohexylcarbodiimid und Essigsäure acetyliert. Dabei wurden 10 mg (0,006mmol) Ampullosporin A in trockenem Dichlormethan suspendiert und mit 6 mg DCC (5facher molarer Überschuß) und 2 mg Eisessig (5facher molarer Überschuß) versetzt und bei RT mit wenig DMAP als Katalysator 24 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde zur Trockene eingeeengt und der Rückstand in MeCN gelöst. Die Reinigung erfolgte über präparative HPLC.

Ausbeute: 4,8 mg (50 %).

#### 3.11.3.2. Glycosidierung des C-Terminus [Fernekorn, 2000]

##### Chemikalien:

Triacetylglucal

Triphenylphosmoniumhydrobromid (TPHB)

Dichlormethan

50 mg (0,03 mmol) Ampullosporin A wurden in trockenem Dichlormethan suspendiert und mit 35 mg (0,1 mmol) TPHB und 110 mg (0,4 mol) Triacetylglucal versetzt. Die Reaktionslösung wurde unter Schutzgasatmosphäre 48 h gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$ - und danach mit gesättigter NaCl-Lösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, zur Trockene eingeeengt und in MeOH aufgenommen. Anschließend wurde das reine Produkt durch Gelpermeationschromatographie (Säulenpackung: LH-20) gewonnen.

Ausbeute: 58,3 mg (50 %)

#### 3.12. Bestimmung der enzymatischen Stabilität

##### Chemikalien:

Pepsin

Pronase

Chymotrypsin

Ampullosporin A-Lösung (0,2 mg / mL in DMSO 10 %)

Kaliumchloridpuffer (KCl 0,1M / HCl 0,1 M 6 / 4 v / v)

Die Enzyme wurden analog der Herstellerangaben gelöst und auf den empfohlenen pH-Wert eingestellt. Je 1 mL der Enzym- und der Ampullosporin-Lösung wurden gemischt und bei

##### Geräte:

Thermoblock

HPLC 1, bzw 2a

37°C im Thermoblock temperiert. Nach 1h, 3h und 12h wurde ein Aliquot abgenommen und mittels HPLC und ESI-MS auf Abbauprodukte untersucht.

### 3.13. Röntgenkristall-Strukturanalyse von Ampullosporin A

Ampullosporin wurde in siedendes MeCN unter Rühren so lange zugegeben bis es sich gerade nicht mehr sofort auflöste. Die Lösung wurde sehr langsam abgekühlt. Dabei fielen Ampullosporinkristalle aus.

Die Röntgenstrukturanalyse wurde an einem Nonius KappaCCD Diffractometer mit graphit-monochromatischer Mo-  $K_{\alpha}$  -Strahlung vorgenommen. Die gemessenen Daten wurden von Lorentz- und Polarisations-Effekten bereinigt [Anonymus, 1998; Otwinowski, 1997]. Die Struktur wurde durch direkte Methoden (SHELX) [Sheldrick, 1990] bestimmt und mit der Methode der kleinsten Quadrate gegen  $F_o^2$  verfeinert.(SHELX-97) [Sheldrick, 1997]. Die Lage der Wasserstoffe der Amino- und Hydroxygruppen sowie der Wassermoleküle wurde durch differentielle Fourier-Synthese bestimmt und isotropisch verfeinert. Alle anderen Wasserstoffatome wurden aus den mit fixierten thermalen Parametern berechneten Positionen eingeführt. Die Nicht-H-Atome wurden anisotrop verfeinert [Sheldrick, 1990]. Für die Strukturdarstellung wurde die XP-Software (SIEMENS Analytical X-ray Instruments, Inc.) benutzt.

Die Röntgenkristall-Strukturanalyse wurde von Herrn Dr. H. Görls, FSU Jena, durchgeführt. Die kristallographischen Daten, Details der Datenaufzeichnung und dem Daten-Refinement von Ampullosporin A sind in Tab. 6.4.1. aufgelistet.

### 3.14. Circular Dichroismus

#### Chemikalien:

TFE

MeCN

SDS-Lösung (50 mM)

Phosphatpuffer pH 7,4

D-Camphersulfonsäure

#### Geräte:

CD-Spektrometer

Quarzküvette (1 mm)

HPLC 1



Zunächst wurden 1 mM Stammlösungen in TFE von den Proben hergestellt. Zur Messung in TFE wurden 80 µL der Stammlösungen mit 720 µL TFE gemischt. Somit erhielt man eine etwa 0,1 mM TFE-Lösung.

Die Meßlösungen in MeCN wurden aus 80 µL Stammlösung und 720 µL MeCN hergestellt.

Die Lösungen in SDS wurden aus 80 µL Stammlösung und 80 µL Phosphatpuffer und 640 µL SDS-Lösung hergestellt [Nguyen, 2002].

Die optische Rotation wurde mit D-Camphersulfonsäure bei 209,5 nm kalibriert [Johnson, 1990]. Drei Scans wurden jeweils mit einer Bandbreite von 2 nm und 20 nm / min bei 22 °C pro Messung durchgeführt. Der Leerwert wurde mit den gleichen Lösungsmitteln bestimmt. Durch HPLC-Messungen wurden die genauen Konzentrationen der Stammlösungen bestimmt. Die Messung erfolgte unter den üblichen HPLC-Bedingungen, allerdings bei 280 nm (Absorption des Tryptophans).

### **3.15. Biologische Testung**

#### **3.15.1. Induktion der Pilzmorphogenese („Phomatest“)**

##### Chemikalien:

Ampullosporin A Standard: 1 mg / mL

Prüflösungen: 1 mg / mL

Kulturmedium A (g/l): Malzextrakt 40, Hefeextrakt 4, Agar 15;

Kulturmedium B (g/l): Kartoffel-Glucose-Agar (Merck): 39;

##### Teststamm:

*Phoma destructiva*

##### Stammhaltung:

Schrägagarkultur mit Kulturmedium A oder B, 11 Tage bei 20 – 25 °C kultiviert, anschließend bei 4 - 6 °C aufbewahrt, Überimpfung im 2-Jahresrhythmus.

##### Testagarmedium:

1:1 Mischung von Kulturagar A und Kulturagar B

##### Impfkultur/Testkeim:

*Phoma destructiva* wurde 11 Tage bei 20 – 25 °C auf Kulturmedium B in Petrischalen (100 mm Ø) kultiviert, danach mit 10 mL einer sterilen 0,9 %igen (m/V) Lösung von NaCl abgeschwemmt.

#### Lochplatten-Agardiffusionstest:

Die Testmethode des Agardiffusionstestes wurde in Anlehnung an den standardisierten Agardiffusionsassay des Europäischen Arzneibuches [Anonymus, 1997] variiert:

40 ml Testagarmedium wurden verflüssigt, auf 50 °C temperiert, mit 8 – 10 mL der Vorkultur beimpft und anschließend in Testplatten (150 mm Ø) gegossen. Nach dem Erkalten wurden 12 Stanzlöcher (Ø 9 mm) mit einem Stempel auf der Platte gestanzt [Benett, 1966].

Jedes Testloch wurde mit 50 µL der zu prüfenden Lösung beschickt. Die so präparierten Platten wurden 4 – 5 Tage bei 20 – 25 °C kultiviert.

Die Bewertung der sich konzentrationsabhängig ausbildenden schwarzbraunen/dunkelblauen Halos von testpositiven Substanzen erfolgte qualitativ im Vergleich zur Standardlösung Ampullosporin A. Die Ergebnisse wurden in Tabellenform zusammengefaßt. Der von der Referenzsubstanz verursachte dunkelgefärbte Halo wurde mit ++ bewertet und die Prüflösungen dementsprechend beurteilt.

#### **3.15.2. Bestimmung der Absenkung der Körpertemperatur (Hypothermietest) [Basinath et al., 1990]**

Chemikalien:

EtOH

NaCl (0,9 %ig)

Tween 20

1 mg der zu prüfenden Substanz wurde in 0,1 mL 96%igem EtOH gelöst und mit isotonischer NaCl-Lösung (0,9%) auf 1 mL aufgefüllt. Bei schlechter Löslichkeit wurde die Probe mit einigen Tropfen Tween 20 in Lösung gebracht. Eine Dosis von 20 mg / kg b.w. (Körpergewicht) wurde den männlichen Mäusen (Stamm NMRI, Zentrales Tierzuchtlabor, Jena) intraperitoneal injiziert. Die Körpertemperatur wurde rectal mit einer Thermistorsonde (Checktemp 1) gemessen. Die Messung der Körpertemperatur erfolgte in Abständen von 5 min, 30 min, 1 h, 3h, 5 h, 7 h und 24 h nach Gabe der Prüflösungen.

Bei einer Absenkung der Körpertemperatur von 0 – 2°C wurde die Testsubstanz als inaktiv, bei Absenkung von 2 – 4°C als aktiv und bei Absenkung von > 4°C als stark aktiv bewertet.

Zusätzlich wurden die Tiere im Hinblick auf Verhaltensänderungen beobachtet: Substanzen mit neuroleptischem Potential vermindern die Bewegungsaktivität, inhibieren Reflexe und senken den Muskeltonus [Basinath, 1990].

Diese Arbeiten wurden von Dr. Härtl und Mitarb. durchgeführt.

### 3.15.3. Radioligand-Bindungsassay

Die Untersuchung auf die Affinität des Ampullosporins zu den Dopamin-Rezeptoren  $D_1$  und  $D_2$  ist von Prof. Lehmann und Mitarbeitern, FSU Jena, durchgeführt worden. Eine Beschreibung der Methode liefern Witt et al. [2000].

Der Einfluß von Ampullosporin auf MK-801 induzierte motorische Stimulation bei Ratten wurde von Prof. Greksch und Mitarb., Otto-v-Guericke-Universität Magdeburg, durchgeführt. Es wurde eine Dosis von 5 mg / kg b.w. Ampullosporin A nach Gabe von 0,3 mg / kg b.w. MK-801 verabreicht. Danach wurde die lokomotorische Aktivität der Tiere gemessen.

Der Einfluß des Ampullosporins A auf Ketamin-induzierten Psychosen wurde ebenfalls von Prof. Greksch und Mitarb. untersucht. Hierbei wurde das Sozialverhalten von Ratten mit einer solchen Psychose nach der Gabe von 5 mg / kg b.w. Ampullosporin A beobachtet.

## 3.16. Messung der Membranaktivität

Chemikalien:

Phosphatidylcholin aus Sojabohnen (Sigma), 20mg / mL n-Heptan

KCl, 0,5 M, aus bidestiliertem Wasser

Stammlösungen: 1mg /mL MeOH

Apparatur: hausintern

Software: EDR for Windows V2.3, 1997-2002 Strathclyde Electrophysiology Software, Dempster, U.K.

PC input: AT-MIO-16X card, National Instruments

Durchführung

Die Messung der Ionenkanalaktivität erfolgte an künstlichen BLM. Kern der Apparatur ist die Meßzelle mit einem Zylinder mit einer 0,05 mm großen Öffnung für die Membran. Auf beiden Seiten der BLM befand sich je eine Elektrode, die in der Art einer Wheatstone'schen Brücke angeschlossen waren (s. Abb 3.16.1).

Die angelegte Spannung wurde auch beim Stromfluß konstant gehalten („Voltage-clamp-technique“). Die Aufzeichnung erfolgte entweder durch einen XY-Schreiber oder rechnergestützt.

In das Reaktionsgefäß wurden etwa 20 mL der 0,5 M KCl-Lösung eingefüllt und mit dem jeweiligen Volumen der Probe versetzt. Dann wurde 5 min gerührt. Danach wurde 1 mL der Lösung in den im Reaktor stehenden Teflonzylinder gefüllt. Mit Hilfe einer 10 mL Eppendorfpipette, bei der die Spitze im vorderen Drittel abgeknickt war, wurde am Loch des Zylinders mit möglichst wenig Lecithin-Lösung die BLM plaziert („bubble-technique“). Durch lichtmikroskopische Kontrolle („black spot“) und Messung der Membrankapazität wurde die Qualität der Membran überprüft. Der Mindestwert der Kapazität lag bei etwa 80  $\mu\text{S}$ . Es wurde jeweils nach genau 10 min die Leitfähigkeit gemessen. Vor jeder Meßreihe wurde ein Leerwert bestimmt. Jede Messung wurde zwei bis dreimal wiederholt.

Zur Reinigung der Gefäße wurde mit bidestilliertem Wasser mehrmals gewaschen. Die Gefäße wurden im Trockenschrank getrocknet. Zu Beginn einer jeden Meßreihe wurden die Reaktionsgefäße mit  $\text{HNO}_3$  conc. von evtl. Rückständen vollständig befreit.

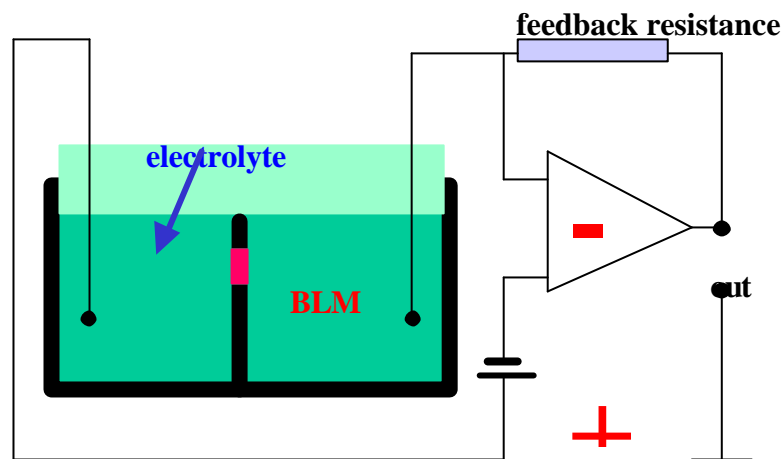


Abb.3.16.1: Schematische Darstellung der Meßzelle

## 4. Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Fermentation und Gewinnung von Ampullosporin A

Für den Labormaßstab bieten sich die Fermentation in Petrischalen oder in Flüssigmedien in Schüttelkolben an (s. Abb. 4.1.1).

Wie bei vielen anderen mycelbildenden Organismen, war es anfänglich schwierig *S. ampullosporum* unter den Bedingungen der Produktbildung zu kultivieren [Reiber, 2003, Schügerl et al., 1998].

Es konnten auf den Agarplatten und in der Emerskultur bis maximal 10 mg/L Ampullosporin gewonnen werden. Die Schüttelkultur erwies sich als deutlich schwieriger. Zumeist war keine Produktion von Ampullosporin zu beobachten.

In einer Arbeit zur Fermentation von Ampullosporin [Reiber, 2003] konnten die Ausbeuten von Ampullosporin bei Submerskultur im 30 L-Fermenter auch nicht gesteigert werden. Es wurden maximale Produktionsraten von 15 mg / mL erreicht.

Die Feststoff-Fermentation (SSF) konnte bei der Kultivierung von Pilzen in vielen Fällen die Ausbeute an Metaboliten erhöhen [te Biesebeke et al., 2002; T. Robinson et al., 2001]. Deshalb und weil sie für filamentös wachsende Pilze, wie dem *S. ampullosporum*, bereits erfolgreich durchgeführt worden ist [Mitchell et al., 2002], wurde der Produzent auch mit dieser Methode kultiviert.

Das Substrat war nach zwei bis drei Wochen vollständig vom Pilz durchwachsen und aufgrund der in Sporen akkumulierten Anthrachinone leuchtend orange gefärbt (Abb. 4.1.1). Es konnten 0,4 g Ampullosporin / kg Trockensubstrat gewonnen werden. Allerdings war aufgrund mitextrahierter Substratbestandteile die Aufreinigung aufwendiger als bei den anderen Fermentationsmethoden.

Die SSF ist trotzdem eine preiswerte und effiziente Methode, um hohe Ausbeuten an Ampullosporin zu erzielen, auch wenn die Fermentationsbedingungen weniger gut einzustellen und zu kontrollieren sind als bei Submersfermentationen [T. Robinson et al., 2001].



Abb. 4.1.1: oben links *S. ampullosporum* in der Feststoff-Fermentation, rechts in einem Flüssigmedium und unten links auf einer Agarkultur. Die Farbe der Sporen ist jeweils gut zu erkennen. In den ersten beiden Kulturen ist auch noch etwas unversporstes weißes Mycel zu vorhanden.

## 4.2. Isolierung des Ampullosporins

Die Aufarbeitung des Pilzextraktes erfolgt aufgrund des physikalisch-chemischen Verhaltens nach den Literaturangaben [Ritzau et al., 1997]. Durch den acetylierten N-Terminus und den hohen Gehalt an Aib hat das Molekül einen hohen lipophilen Anteil. Dagegen sind die Glutaminseitenketten und der Alkoholrest hydrophil, so dass Ampullosporin mittelpolar ist und sowohl in lipophilen Lösungsmitteln (Hexan, Chloroform) als auch in Wasser schlecht bzw. unlöslich ist. Gut löslich ist es in Methanol.

In der Adsorptionschromatographie an Kieselgel mit Chloroform / Methanol-Gradienten wird Ampullosporin bei einem Chloroform-MeOH-Verhältnis von 7 / 3 eluiert.

Die anschließende Gelpermeationschromatographie trennt Ampullosporin von den Begleitstoffen aufgrund seiner Molekülgröße ab. Sephadex LH20 ist eine übliche präparative Trennmethode in der Naturstoffchemie, da sie schnell, verlustarm und effizient ist [Henke, 1994].

Ampullosporin wird als erste Substanz eluiert und ist nach diesem Aufarbeitungsschritt fast rein. Allerdings ist es noch leicht gefärbt, was vor allem auf mitextrahierte Anthrachinone und Substratbestandteile, insbesondere bei der SSF-Methode, zurückzuführen ist.

Die abschließende präparative HPLC diene zur Abtrennung der letzten Verunreinigungen.

Ein rein weißes Produkt konnte durch Umkristallisation aus MeCN erhalten werden.

### 4.3. Auftrennen des Ampullosporinkomplexes

Bei genauer Betrachtung des HPLC-Chromatogramms fiel eine Gruppe von Peaks vor dem Peak des Ampullosporins A auf. Da aufgrund der Biosynthese und dem Vergleich mit anderen Peptaibolen die Existenz eines mikroheterogenen Komplexes von Ampullosporinen wahrscheinlich erschien, wurde dieser Gruppe genauer untersucht. Die LC-MS-Analyse ergab, dass es sich um Homologe mit jeweils 14 Masseinheiten Unterschied zum Ampullosporin A handelte (Abb. 4.3.2). Durch Variation der mobilen Phase in der präparativen HPLC konnten vier weitere, zeitlich früher als die Hauptfraktion eluierende Fraktionen getrennt werden (s. Abb. 4.3.1). Es konnten aus einem Gramm Ampullosporin 22, 34, 29 bzw. 16 mg der Nebenfraktionen gewonnen werden.

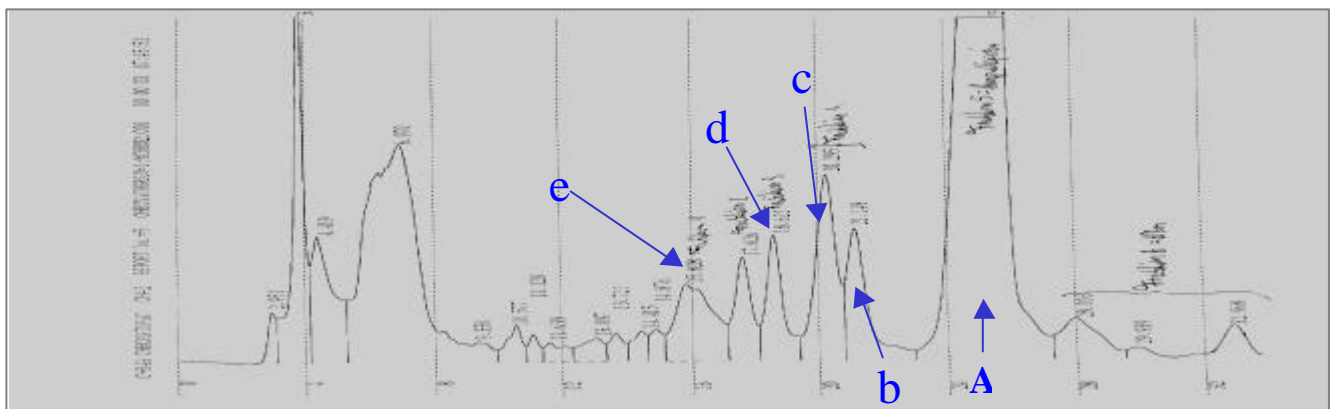


Abb. 4.3.1: Chromatogramm der präparativen HPLC. Hervorzuheben sind die vier Fraktionen b-e, die vor dem Hauptpeak Ampullosporin A eluieren.

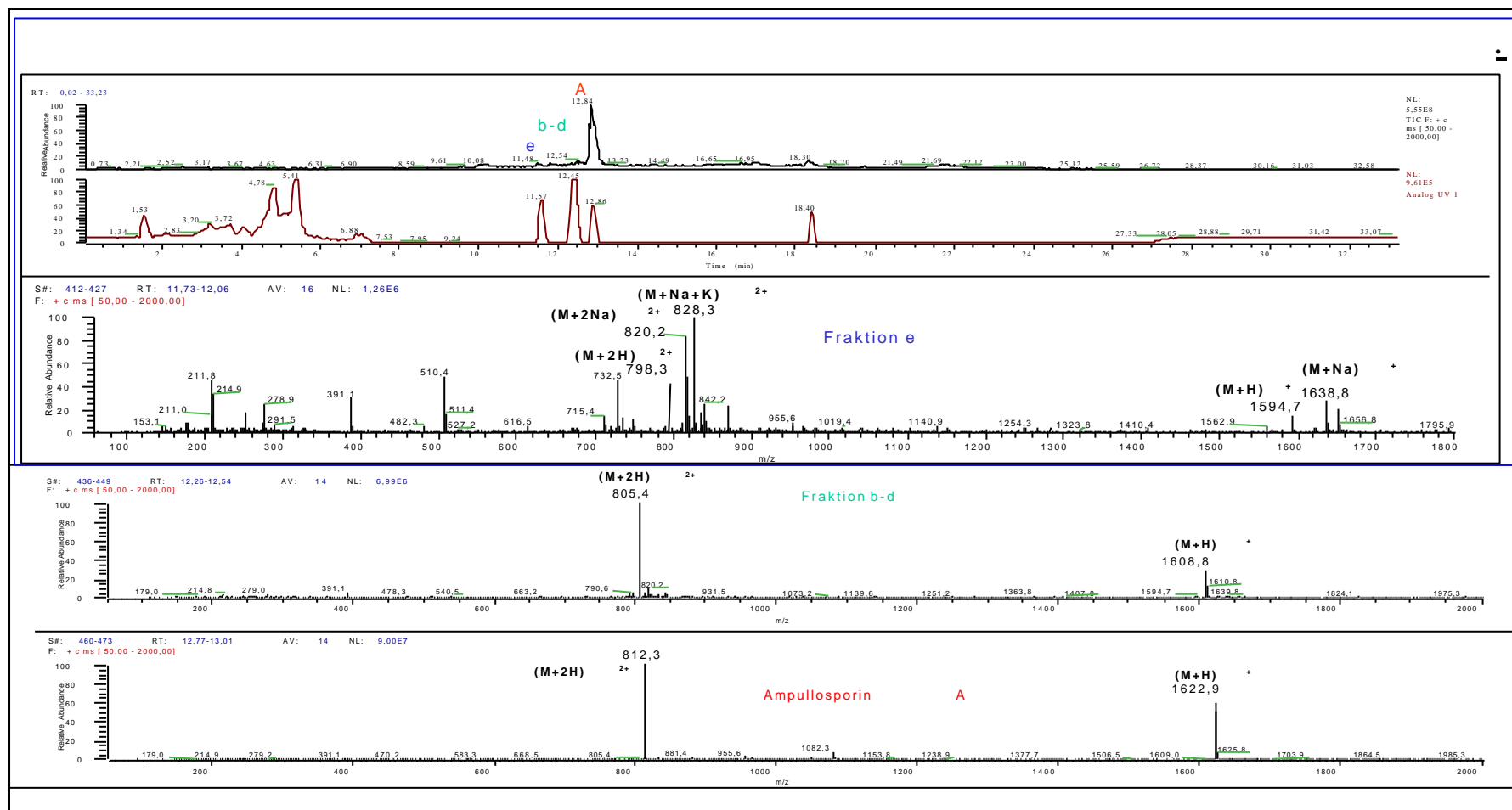


Abb.4.3.2: LC-ESI-MS des Rohampullosporins. Zusätzlich zum  $[M+H]^+$ -Peak des Amp. A sind Fraktionen mit kleineren Molmassen erkennbar.



## 4.4. Strukturaufklärung der NebenkompONENTEN

### 4.4.1. Massenspektroskopische Methoden

#### 4.4.1.1 Allgemeine Bemerkungen zur Massenspektrometrie

Für die Strukturaufklärung von Biomolekülen und insbesondere von Peptiden ist die moderne Massenspektrometrie die Methode der Wahl [Gräfe, 2001; Degenkolb, 2003]. Sie ist hinreichend genau, schnell und vergleichsweise leicht auszuwerten.

Die Summenformel eines Moleküls kann mit der hochauflösenden Massenspektrometrie (HR-MS) bis zu einem Molgewicht von 5000 Da [Lehmann, 1996] bestimmt werden.

Diagnostische Fragmentationen liefern Hinweise auf funktionelle Gruppen. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass bei der Strukturaufklärung von Peptiden mit Hilfe der MS/MS und MS<sup>n</sup> die Aminosäuresequenz aufgeklärt werden kann [Gräfe, 2001].

Durch die Tandem MS bzw MS<sup>n</sup> ist es möglich die Fragmente, die bei den hochenergetischen Ionisierungsmethoden wie EI und FAB in einem Spektrum sind, zu trennen und dadurch sehr viel einfacher auszuwerten.

Peptide fragmentieren vornehmlich an den Peptidbindungen. So kann aus der schrittweisen Fragmentierung eines Peptids, dessen Aminosäuresequenz aus dem Massenunterschied bestimmt werden.

Die Fragmente werden nach Biemann, angelehnt an Roempstorff & Fohlmann, 1984 klassifiziert [Biemann, 1992].

Der Bindungsbruch kann zwischen dem  $\alpha$ -C-Atom und dem Carbonyl-C-Atom, zwischen dem Carbonyl C und dem n+1 –Stickstoff oder zwischen dem n+1-Stickstoff und dem n+1  $\alpha$ -Kohlenstoff erfolgen. Verbleibt die Ladung bei der Spaltung am N-terminalen Fragment so werden die entsprechenden Fragmente als a-, b- bzw. c-Typ klassifiziert; verbleibt sie hingegen am C-Terminus, werden die entstehenden Fragmente entsprechend mit x, y und z bezeichnet. Ist der Bindungsbruch von einer Wasserstoff-Übertragung begleitet, wird jedes übertragene Atom durch einen Strich – symbolisiert, befindet sich dieser auf der linken Seite, bedeutet dies einen Verlust eines Atoms; auf der rechten Seite hingegen ein zusätzliches Atom (Abb. 4.4.1.1).

Meist erfolgt bei Peptiden eine Fragmentierung nach dem b-Typ, weil so die positive Ladung am Stickstoff stabilisiert wird [Degenkolb et al., 2003].

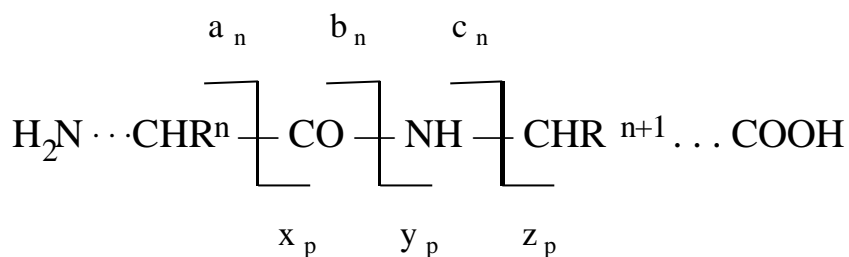


Abb. 4.4.1.1: Nomenklatur bei der Peptidfragmentierung [nach Biemann, 1992]

#### 4.4.1.2. Auswertung der MS

In den Fraktionen b-d wurden Quasimolekül-Ionen der Masse 1608  $[M+H]^+$  detektiert, in der Fraktion e  $m/z$  1594  $[M+H]^+$ . Diese Masseunterschiede deuteten auf fehlende Methylengruppen hin (s. Abb. 4.3.2). Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden die Fraktionen mittels MS/MS und  $MS^n$  analysiert.

Diese Messungen ergaben, dass in den Fraktionen b-d jeweils ein Aib-Rest gegen ein Alanin ausgetauscht ist und zwar in den Positionen 8, 9 und 10.

Diese neuen Homologen des Ampullosporins A sind Positionsisomere und wurden mit B (Austausch in Position 8), C (in Position 9) und D (in Position 10) bezeichnet (s. Abb. 6.2.1-3 u. Tab. 4.4.1.1).

Die Fraktion e fiel bei dieser Untersuchung auf, da kein einheitliches Fragmentierungsmuster in der  $MS^n$  zu beobachten war. Vielmehr handelte es sich um ein Gemisch mehrerer Positionsisomere der Masse 1594  $[M+H]^+$ . Hier zeigt sich die Leistungsfähigkeit der Methode zur Strukturaufklärung, da die Aminosäuresequenz der verschiedenen Positionsisomere zugeordnet werden konnte (s. Abb. 6.2.4 und 5).

Es sind jeweils zwei Aib-Reste gegen Alanin ausgetauscht und zwar an den Positionen 8-10 und 13. Zur Sequenz der Ampullosporine E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub> s. Tab. 4.4.1.1.

Tab. 4.4.1.1: Sequenz der neuen Ampullosporine B, C, D und E1-E4

Amp/Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
B	Ac-Trp	Ala	Aib	Aib	Leu	Aib	Gln	<b>Ala</b>	Aib	Aib	Gln	Leu	Aib	Gln	Leuol
C	Ac-Trp	Ala	Aib	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	<b>Ala</b>	Aib	Gln	Leu	Aib	Gln	Leuol
D	Ac-Trp	Ala	Aib	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	<b>Ala</b>	Gln	Leu	Aib	Gln	Leuol
E1	Ac-Trp	Ala	Aib	Aib	Leu	Aib	Gln	<b>Ala</b>	Aib	Aib	Gln	Leu	<b>Ala</b>	Gln	Leuol
E2	Ac-Trp	Ala	Aib	Aib	Leu	Aib	Gln	<b>Ala</b>	<b>Ala</b>	Aib	Gln	Leu	Aib	Gln	Leuol
E3	Ac-Trp	Ala	Aib	Aib	Leu	Aib	Gln	Aib	Aib	<b>Ala</b>	Gln	Leu	<b>Ala</b>	Gln	Leuol
E4	Ac-Trp	Ala	Aib	Aib	Leu	Aib	Gln	<b>Ala</b>	Aib	<b>Ala</b>	Gln	Leu	Aib	Gln	Leuol

#### 4.4.2. Kernresonanzspektroskopie

Zur Absicherung der mit Hilfe verschiedener massenspektrometrischer Methoden (siehe 4.4.1.) gewonnenen Sequenzen der Ampullosporine B-D wurde die Struktur der Substanzen durch NMR-Spektroskopie bestätigt. Die Ampullosporine C und D wurden sowohl mit ein- als auch mit zweidimensionalen Methoden analysiert. Durch  $^1\text{H}$   $^1\text{H}$  –COSY, HSQC, HMBC und NOESY- Korrelationen konnten die  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -Signale zugeordnet werden.

Ampullosporin B wurde wegen der geringeren Ausbeute nur eindimensional vermessen. Hier erfolgte die Zuordnung der NMR-Signale durch den Vergleich mit den bekannten Spektren der Ampullosporine A, C und D und mithilfe der ACD-Software [1999], die NMR-Spektren berechnet. Zur Zuordnung s. Tab. 6.3.1-3.

#### 4.4.3. Bestimmung der Chiralität der Aminosäuren

Da NRPS-Systeme auch D- Aminosäuren in die Sequenzen einzubauen vermögen [Traber et al., 1982], erwies sich eine Chiralitätsbestimmung der Aminosäuren der Ampullosporine B-E als notwendig. Hierfür ist die Derivatisierung mit 1-Fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamid die Methode der Wahl, da:

- die Umsetzung leicht durchzuführen ist und die entstehenden Diastereomere bei entsprechend kühler Lagerung (4 °C) über Monate stabil sind;
- die Trennung der entstandenen Diastereomere an den vorhandenen HPLC-Anlagen mit handelsüblichen RP-Säulen durchgeführt werden kann,
- die Detektion aufgrund der verwendeten Wellenlänge von 340 nm nur wenig durch andere Begleitsubstanzen gestört wird [Kochar et al., 2000].

Hinzu kommt, dass die Empfindlichkeit der Methode bis in den subnanomolaren Bereich reicht. Somit kann auch die Chiralität des Tryptophans bestimmt werden, das bei der sauren Hydrolyse teilweise zerstört wird [Kochar et al., 2000].

Die Analyse ergab, dass in allen Homologen nur die L-Enantiomere vorlagen (s. Tab. 4.4.3.1)

Tab. 4.4.3.1: Retentionszeiten der Standardaminosäuren

Aminosäure	Retentionszeit	$t_R$ der Ampullosporine B-E			
L-Ala	12,6	12,5	12,6	12,7	12,7
D-Ala	15,4				
L-Gln	27,8	27,8	27,8	27,6	27,8

D-Gln	33,1				
L-Leu	25,1	24,9	25,0	24,9	24,8
D-Leu	32,5				
L-Trp	25,6	25,6	25,6	25,6	25,4
D-Trp	30,4				

## 4.5. Vorläuferorientierte Biosynthese

### 4.5.1 Allgemeine Bemerkungen zur gerichteten Biosynthese

Bei der vorläuferorientierten bzw. gerichteten Biosynthese (precursor orientated directed biosynthesis) wird dem Organismus ein bestimmter Baustein oder sehr ähnlicher Baustein des von ihm produzierten Stoffes im Überschuß angeboten. Man erhofft sich dadurch die Lenkung hin zu einem Hauptprodukt oder die Produktion eines neuen, abgewandelten Stoffes. Dies ist nur bei genügend hoher Substrattoleranz möglich. Bei der normalen ribosomalen Synthese von Sekundärmetaboliten liegt eine hohe Substratspezifität vor. Bei der Synthese über den nichtribosomalen Weg, wie hier beim Ampullosporin, ist hingegen ein Einbau von Bausteinanaloga prinzipiell möglich.

Für Peptaibole bzw Lipoaminopeptide ist die gerichtete Biosynthese bei den Produzenten *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum*, *Tolytlocadium geodes* und *Mycogone rosea* erfolgreich durchgeführt worden. Dabei wurde sowohl die Produktion auf ein Hauptprodukt gelenkt als auch neue Peptaibole gewonnen [Leclerc, 1998; Krasnoff et al. (b), 1991, Degenkolb, 2000].

Diese erfolgreich durchgeführten Versuche zur vorläuferorientierten Biosynthese gaben Anlaß zu der Hypothese, dass auch das Produktspektrum des Ampullosporinkomplexes verändert werden könnte.

### 4.5.2. Gerichtete Biosynthese

Die Ermittlung eines optimalen synthetische Mediums ergab, dass *S. ampullosporum* bei der Anwesenheit von Calciumcarbonat, das zur Abpufferung des Mediums während des Wachstums dienen sollte, nicht wächst. Außerdem produziert es bei der Zugabe von Glucose statt des Disaccharids Maltose etwas mehr Ampullosporin. Ob diese erhöhte Produktion

signifikant ist wurde nicht weitergehend untersucht (s. Tab 4.5.2.1.). Die gerichtete Biosynthese wurde mit dem Glucosemedium ohne Calciumcarbonat durchgeführt.

Tab. 4.5.2.1.: Wachstum und Produktionsrate der verschiedenen Kunstmedien, -: kein Wachstum, +: mäßiges Wachstum, ++: gutes Wachstum, +++: sehr gutes Wachstum

Medium	Wachstum	Ampullosporingehalt
Variante 16	++, gelbes Mycel	8,2 µg/mL
Variante 17	-	-
Variante 24	++, gelbes Mycel	1,3 µg/mL
Variante 25	-	-
Variante 26	+++, gelbes Mycel	3,6 µg/mL
Variante 27	-	-

Tab 4.5.2.2.: Supplementierte Aminosäuren und dadurch erwarteter Effekt.

D,L-Isovalin	Ersatz von L-Ala bzw Aib
L-Glutaminsäure	Ersatz von L-Gln
L-Tryptophan	Produktionssteigerung
L-Tyrosin	Ersatz von L-Trp
D,L-Phenylalanin	Ersatz von L-Trp
L-Asparagin	Ersatz von L-Gln
Aib	Ersatz von L-Ala, Produktionssteigerung
L-Alanin	Ersatz von Aib
D,L-Valin	Ersatz von L-Ala bzw. Aib
5-OH-L-Tryptophan	Ersatz von L-Trp
5-F-L-Tryptophan	Ersatz von L-Trp

In der obigen Tabelle sind die erhofften Effekte durch die Zugabe der Aminosäuren aufgelistet. Es konnte in keinem Fall ein Einbau der zugesetzten Aminosäuren festgestellt werden. Allerdings wurden unterschiedlich hohe Produktionsraten des Ampullosporins A beobachtet. Mit der Zufütterung der Aminosäuren 5-OH-Tryptophan, Glutaminsäure und Aib konnte die Ausbeute an Ampullosporin gegenüber der normalen Fermentation gesteigert werden. Mit Tryptophan und L-Valin wurde eine übliche Produktionsrate erreicht. Mit den Aminosäuren L-Alanin und L-Asparagin wurde die Produktion wesentlich vermindert. 5-F-Tryptophan wirkte als Wachstumsinhibitor (s. Tab. 4.5.2.3.).

Tab 4.5.2.3: Wachstum von *S. ampullosporum* und Ausbeuten an Ampullosporin bei der gerichtete Biosynthese. Medien: X: ohne Zusatz von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Y: mit Zusatz von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; W: weiß, O: orange, G: gelb, Br: bräunlich

	X					Y				
	Wachstum	EE-Extrakt [mg TM]	Farbe	pH	Amp A [ $\mu\text{g}$ ]	Wachstum	EE-Extrakt [mg TM]	Farbe	pH	Amp A [ $\mu\text{g}$ ]
D,L-Isovalin	xxx	43	o	5,0	0	Xxx	18	o-w	3,0	0
L-Glutaminsäure	xx	35	w-g	2,5	330	Xx	4	w-g	3,0	190
L-Tryptophan	x	2	o	3,5	56	Xx	1	o	3,0	100
L-Tyrosin						(x)	4	w	2,0	0
D,L-Phenylalanin						(x)	7	w	1,5	17
L-Asparagin						Xxx	46	br	3,5	16
Aib						Xxx	31	w	3,0	515
L-Alanin						X	4	w	3,5	0
D,L-Valin						X	4	w-o	2,5	135
5-OH-L-Trp	xxx	44	w-br		79					
5-F-L-Trp	-	-	-	-	-					

#### 4.6. Derivatisierung des Ampullosporins A

Durch die HPLC-Auftrennung des Ampullosporin-Komplexes konnte die Variationsbreite innerhalb der Aminosäuresequenz von Ampullosporin vergrößert werden. Wie oben dargestellt, konnten sieben neue Sequenzen strukturell aufgeklärt werden. Da aber die Ampullosporine E<sub>1</sub>-E<sub>4</sub> nicht getrennt werden konnten, reduziert sich die Anzahl der biologisch untersuchbaren neuen Sequenzen auf drei, die Ampullosporine B-D.

Aufgrund der aus der Kristallstruktur gewonnenen Daten und theoretischer Überlegungen zur biologische Wirkung und der Membranaktivität wurde Ampullosporin zielgerichtet modifiziert.

#### 4.6.1 Abspaltung des Tryptophans

Aromatische Aminosäuren wie das Tryptophan gelten als Anker an der Phasengrenze Membran-Umgebung bei membranaktiven Substanzen wie den Ampullosporine [Yau et al., 1998; Killian et al., 2000].

Aus diesem Grund wurde mit einer spezifischen Reaktion das Tryptophan abgespalten.

N-Brom-Succinimid wird in der Literatur als spezifische Spaltungsreagenz für Tryptophan beschrieben, da es am Indolring angreift [Bodanzky et al., 1993]

Meist wird NBS als Bromierungsreagenz eingesetzt. Dabei reagiert es als Brom-Radikal, und es muß mit wasserfreien Lösungsmitteln gearbeitet werden. Die Abspaltungsreaktion verläuft aber unter radikalischem Charakter, und Spuren von Wasser lenken vom Bromradikal zum positiven Bromoniumion [Horner et al., 1959]. Daher musste mit Lösungsmitteln gearbeitet werden, in denen Spuren von Wasser enthalten waren.

Es handelt sich um eine  $S_N2$ -Reaktion. Der Reaktionsmechanismus ist in Abb. 4.6.1.1 dargestellt.

Der Strukturbeweis erfolgte durch ESI-MS,  $MS^n$  (s. Abb. 6.2.6 und Tab. 6.2.10) und NMR (s.Tab. 6.3.4). Zur biologischen Wirkung siehe unten. Dieses Produkt erhält die Bezeichnung **NMK006**.

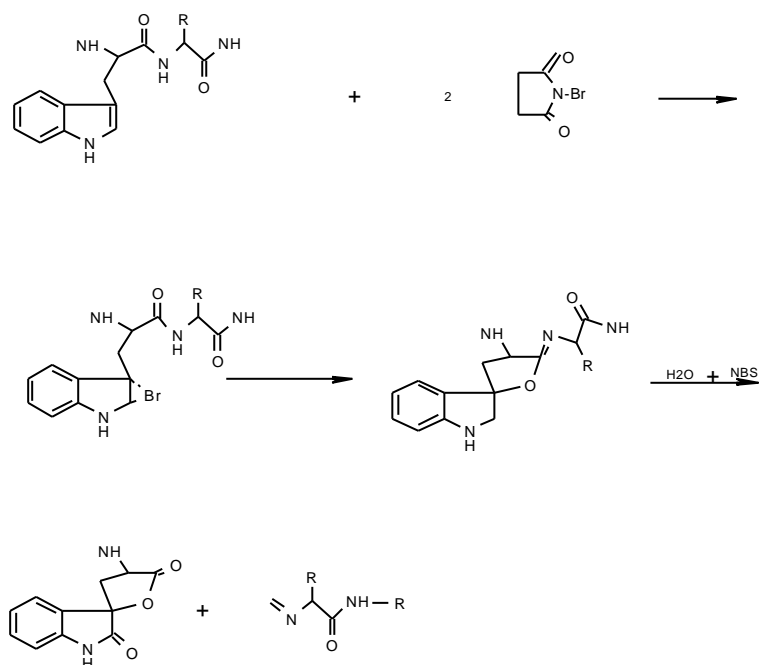


Abb. 4.6.1.1: Zunächst lagert sich das  $Br^+$  an die Doppelbindung an, dann greift der Carbonylsauerstoff des Alanins an der Position 3' an, und es kommt zum Ringschluß. Durch oxidative Hydrolyse wird der Ring vom Peptidrest abgespalten [Witkop, 1968; Bodanski, 1993].



#### 4.6.2. Methylierung der Glutaminseitenketten

Aus der Kristallstruktur des Ampullosporins A ist zu erkennen, dass die Moleküle untereinander über Wasserstoffbrücken zwischen den Glutaminseitenketten verknüpft sind. Diese Wasserstoffbrücken können auch in der Membran zur Stabilisierung der Poren ausgebildet werden.

Die Blockierung dieser funktionellen Gruppen sollte demzufolge eine veränderte Wirkung bedingen. Dazu wurden die Stickstoff-Atome der Säureamide methyliert.

Dafür musste eine sehr milde Methode entwickelt werden, da nur die Stickstoff-Atome in den Seitenketten und nicht die der Peptidkette methyliert werden sollen. Die üblichen Umsetzungen mit Metallhydriden erwiesen sich als zu drastisch. Methylierungen mit Silberoxid als Base und Methyljodid als Methylierungsreagenz werden in der Zuckerchemie häufig eingesetzt [Reinfeld et al., 1971, Kuhn et al., 1955].

Auch Ampullosporin konnte mit dieser Methode erfolgreich methyliert werden. Sie ist somit nicht nur für Zucker sondern auch für Peptide als milde Methylierungsreaktion geeignet.

Es konnte jedoch kein einheitliches Produkt gewonnen werden. Auch die Variation von Temperatur, Reaktionszeit und Konzentration der Reaktanden brachte keine Lenkung zu einem einheitlichen Produkt. Die verschiedenen Methylierungsgrade von zweifach bis achtfach konnten mittels der ESI-MS nachgewiesen werden (Abb. 4.6.2.1).

Durch mehrmaliges Aufreinigen über präparativer HPLC konnte das sechsfach methylierte Derivat als Hauptkomponente gewonnen werden.

Der Strukturbeweis erfolgte über MS und MS<sup>n</sup> (s. Abb 6.2.9 und Tab. 6.2.10). Das Produkt ist am Glutamin 7 und 11 zweifach am Glutamin 14 einfach und am Leucinol 15 O-methyliert (s. Abb. 4.6.2.1). Dieses Produkt erhält die Bezeichnung **NMK012**.

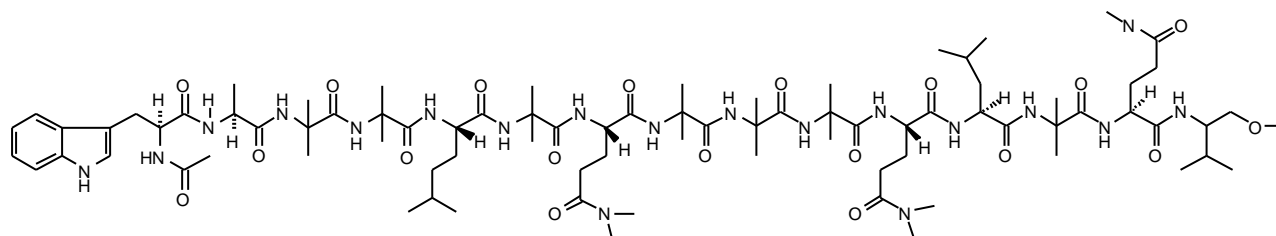


Abb. 4.6.2.1: sechsfach methyliertes Ampullosporin A

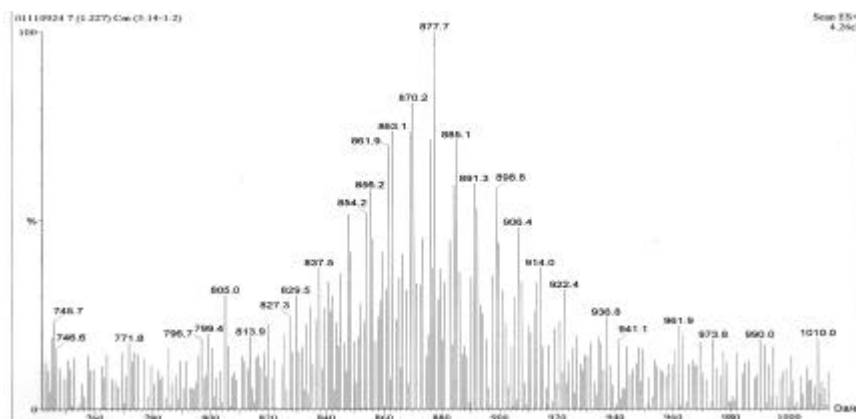


Abb. 4.6.2.2: ESI-MS des Produktgemisches der Methylierungsreaktion. Man erkennt den Berg der Methylierungsprodukte rund um das sechsfachmethylierte Hauptprodukt.

$[M+Na]^+ = 855$ , dreifach;  $[M+Na]^+ = 861$ , vierfach;  $[M+Na]^+ = 870$ , fünffach;  $[M+Na]^+ = 877$ , sechsfach;  $[M+Na]^+ = 885$ , siebenfach;  $[M+Na]^+ = 891$ , achtfach methyliert

### 4.6.3. Reaktionen am C-Terminus

Ampullosporin ist für ein membranaktives Agens relativ kurz. Durch zielgerichtete Modifikationen am C-terminalen Alkohol sollte versucht werden, die Porenbildungsaktivität zu steigern. Desweiteren kann die Polarität des Ampullosporins durch geeignete Chemikalien, wie zum Beispiel Zucker, verändert werden. Dies ist wichtig, da Ampullosporin schlecht wasserlöslich ist, was einer therapeutischen Anwendung im Wege steht.

#### 4.6.3.1 Veresterung mit Essigsäure

Die Veresterung der Alkoholgruppe mit Acetanhydrid bzw. DCC dienen als Modellreaktionen. Die Umsetzung mit Acetanhydrid ist eine klassische Methode zur Veresterung von Alkoholen [Beyer & Walter, 1991].

Die Kopplungsreagenz DCC ist aufgrund der milden Bedingungen weitverbreitet und wird in der Peptidsynthese routinemäßig eingesetzt [Fieser, 1980].

Mit beiden Methoden konnte das Acetat in ähnlichen Ausbeuten erhalten werden. Der Strukturbeweis erfolgte durch ESI-MS,  $MS^n$  (s. Abb. 6.2.7 und Tab. 6.2.10) und NMR (s. Tab. 6.3.5). Dieses Produkt erhält die Bezeichnung **NMK010**.

#### 4.6.3.2 Glycosidierung des C-Terminus

In der Literatur sind einige Glykosidierungsreaktionen beschrieben. Die bekannteste ist sicherlich die Koenigs-Knorr-Reaktion. Sie hat einige Nachteile, so verläuft die

Halogenierung der Zucker nur unter sehr drastischen Bedingungen und erfordert Schwermetallsalze als Katalysatoren, die nachträglich nur sehr schwer restlos zu entfernen sind und falsch positive Wirkungen in Biotests zur Folge haben können [Schmidt, 1986; Paulsen, 1982]. Eine Alternative ist die Glycosidierung mit Glucalen. Hierbei erhält man 2-Desoxyzucker, ein in der Natur häufiges Strukturmerkmal [Sabesan, 1991]. Glucale haben aufgrund der Doppelbindung zwischen C1 und C2 Vinylothereigenschaften. Elektrophile Reaktionen finden am C2-Atom statt, während Nucleophile am C1 angreifen und Glycosidierungen durch  $S_N2$ -Reaktion des Aglycons ersetzt werden. Die Reaktion erfolgt mit dem Katalysator TPHB, dabei addiert Hydrobromid an die Doppelbindung des Glucals, im zweiten Schritt wird das Bromid durch das Aglykon ersetzt. Diese Reaktion läuft schon bei mildesten Bedingungen ab [Krüger-Velthuisen, 2003 ; Bolitt, 1990].

Die Umsetzung des Ampullosporins A mit Triacetylglucal konnte erfolgreich durchgeführt werden und man erhielt das säurelabile O-Glycosid. Der Strukturbeweis erfolgte durch ESI-MS,  $MS^n$  (s. Abb. 6.2.8 und Tab. 6.2.10) und NMR (s.Tab. 6.3.6). Das Produkt erhält die Bezeichnung **NMK011**.

Zur biologischen Wirksamkeit der Derivate siehe Kapitel 4.9. und 4.10.

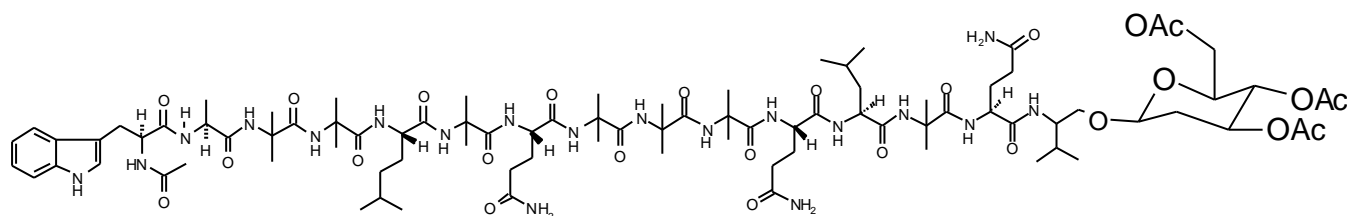


Abb. 4.6.3.2.1: Struktur des Triacetylglucosids des Ampullosporins A

#### 4.7. Bestimmung der enzymatischen Stabilität von Ampullosporin A

Biologisch aktive Peptide sind in ihrer Wirksamkeit durch proteolytischen Abbau begrenzt [Dixon et al., 1990]. Deshalb wurde die *in vitro*-Stabilität von Ampullosporin A gegenüber Proteasen getestet.

Die Pankreasprotease Chymotrypsin hydrolysiert aromatische Aminosäuren spezifisch an der Carboxylgruppe der peptidischen Bindung [Voet & Voet, 1992]. Ampullosporin sollte daher vom Chymotrypsin zwischen Trp1 und Ala2 gespalten werden. Mit dieser Protease kann also

der Einfluß der Acetylgruppe auf die Stabilisierung des Ampullosporins gegen proteolytischen Abbau untersucht werden.

Pepsin, eine Endopeptidase des Verdauungstraktes, hydrolysiert Peptide weniger spezifisch, greift aber auch bevorzugt hydrophobe Reste, die im Peptid an der Position  $R_n$  stehen, an [Voet & Voet, 1992; Elliot & Elliot, 1997]. Im Ampullosporin sind das vor allem die Leucinreste. Diese haben jeweils mit  $R_{n-1}$  einen Aib-Rest als Nachbarn. Hiermit kann also der Einfluß der nichtproteinogenen Aminosäure untersucht werden.

Pronase ist ein Gemisch verschiedener proteolytischer Enzyme. Damit wurde abschließend die allgemeine Stabilität bestimmt.

Mit keinem der Enzyme konnte Ampullosporin A hydrolysiert werden. Sowohl die Acetylierung am N-Terminus als auch die Aib-Einheiten verhindern den Angriff durch Proteasen.

Dieses Ergebnis konnte auch durch die Digestion des Ampullosporins mit Leberhomogenat bestätigt werden. Hierbei wurde die proteolytische Stabilität von Ampullosporin A und synthetischen Analoga, denen die Acetylgruppe fehlten bzw. die Aib-Reste gegen L-Alanin ausgetauscht waren, untersucht. Die beiden Analoga wurden durch das Leberhomogenat gespalten, während das Ampullosporin nicht hydrolysiert wurde [Nguyen, 2003 (a); Nguyen et al., 2002].

#### **4.8. Kristallstruktur von Ampullosporin A**

##### **Kristallpackung**

Die Ampullosporinmoleküle sind im Kristall antiparallel angeordnet und Kopf-Schwanz verknüpft (s. Abb. 4.8.1). Eine asymmetrische Einheit besteht aus einem einzigen Molekül. Zusätzlich sind noch je Ampullosporinmolekül ein Acetonitril- und zwei Wassermoleküle im Kristall gebunden.

Die head-to-tail-Verknüpfung besteht aus drei Wasserstoffbrücken (s. Tab 4.8.1). Die eine verbindet das Rückgrat-NH des Ac-Trp<sup>1</sup> mit dem Rückgrat-CO des Gln<sup>14</sup>. Die beiden anderen, etwas schwächeren bestehen zwischen dem Ala<sup>2</sup> bzw dem Aib<sup>3</sup> und der Carbonylgruppe der Seitenkette des Gln<sup>14</sup>.

Die weiteren intramolekularen Wasserstoffbrücken ( $N^{\epsilon}(\text{Gln}^7) / O(\text{Ac}^0)$ ;  $N^{\epsilon}(\text{Gln}^{11}) / O(\text{Aib}^{10})$ ;  $N^{\epsilon}(\text{Gln}^{14}) / O^{\epsilon}(\text{Gln}^7)$ ;  $N^{\epsilon}(\text{Gln}^{14}) / O^{\epsilon}(\text{Gln}^{11})$ ) ordnen benachbarte Moleküle antiparallel. Dabei

sind zwei benachbarte Moleküle aufgrund dieser H-Brücken deutlich versetzt zueinander angeordnet (s. Abb. 4.8.1)

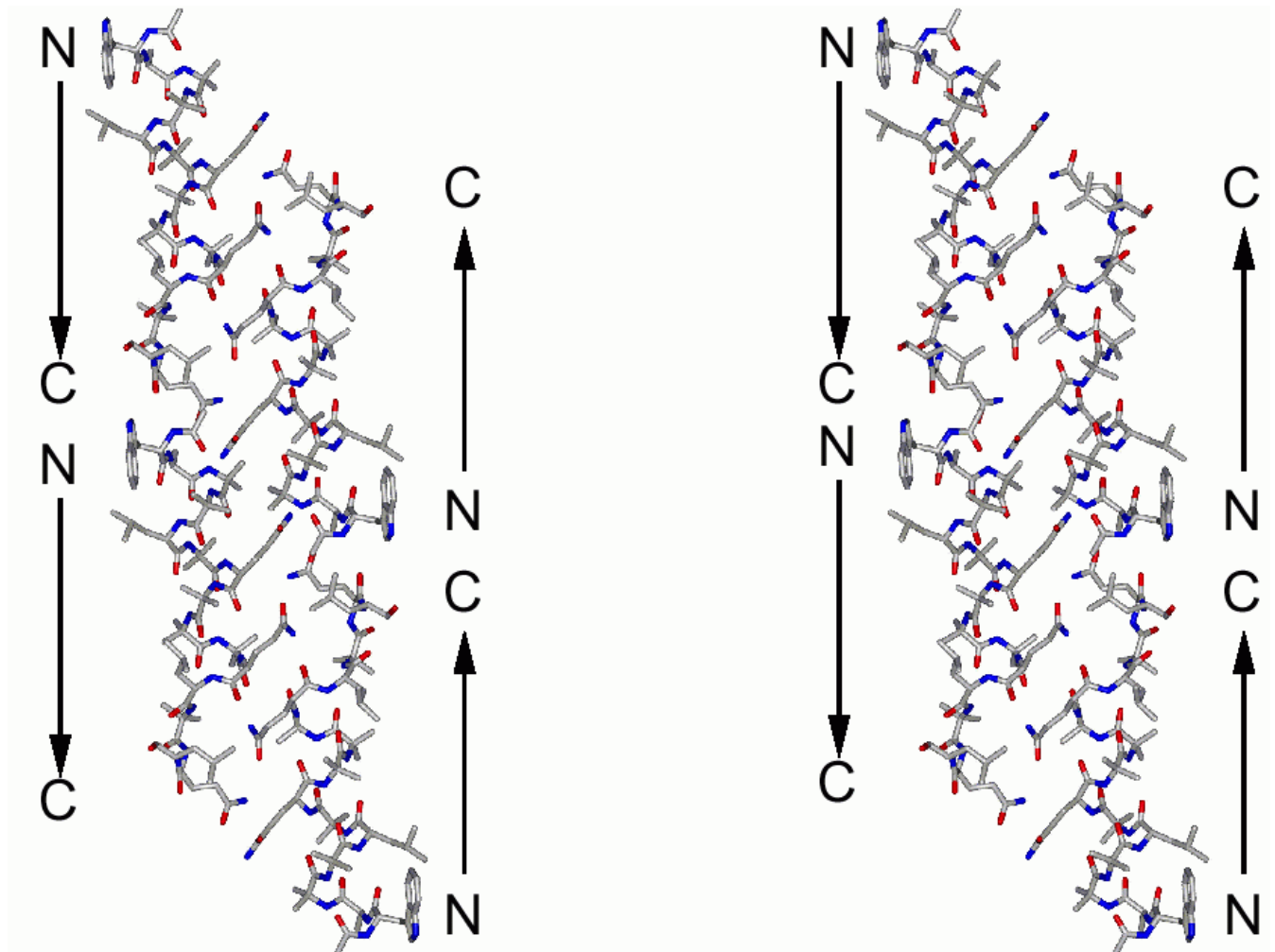


Abb. 4.8.1: Stereo view der Kristallpackung von Ampullosporin A. Man sieht zwei antiparallele Stränge mit je zwei Kopf-Schwanz verbundenen Molekülen. Wasserstoffatome und Lösungsmittelmoleküle sind nicht dargestellt. Die Abbildungen des Abschnitts sind von Herrn Dr. M. Bohl und Herrn Dr. J. Sühnel mit SYBYL-Software erstellt worden.

Tab. 4.8.1: Geometrische Parameter der inter- und intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der Röntgenkristallstruktur. D-H...A-Wechselwirkungen werden bei einem Abstand  $< 3.5 \text{ \AA}$  als Wasserstoffbrückenbindung definiert. Setzt man den Abstand  $\text{H...A} < 2.5 \text{ \AA}$  verringert sich die Anzahl intramolekularer H-Brücken auf 10.

Typ	H-donor (D)	H-akzeptor (A)	Abstand D...A ( $\text{\AA}$ )	Abstand H...A ( $\text{\AA}$ )	Winkel D-H...A ( $^\circ$ )
Intramolekular					
i+4,i	N(Aib <sup>4</sup> )	O(Ac <sup>0</sup> )	2.918	2.157	168
i+4,i	N(Leu <sup>5</sup> )	O(Ac-Trp <sup>1</sup> )	2.954	2.311	155
i+4,i	N(Aib <sup>6</sup> )	O(Ala <sup>2</sup> )	3.026	2.247	159
i+4,i	N(Gln <sup>7</sup> )	O(Aib <sup>3</sup> )	3.101	2.395	158
i+4,i	N(Aib <sup>8</sup> )	O(Aib <sup>4</sup> )	2.844	2.130	173
i+4,i	N(Aib <sup>9</sup> )	O(Leu <sup>5</sup> )	3.018	2.201	166
i+4,i	N(Aib <sup>10</sup> )	O(Aib <sup>6</sup> )	3.367	2.702	157
i+3,i	N(Aib <sup>10</sup> )	O(Gln <sup>7</sup> )	3.149	2.740	119
i+4,i	N(Gln <sup>11</sup> )	O(Gln <sup>7</sup> )	3.162	2.523	161
i+3,i	N(Gln <sup>11</sup> )	O(Aib <sup>8</sup> )	3.137	2.714	124
i+4,i	N(Leu <sup>12</sup> )	O(Aib <sup>8</sup> )	2.831	2.059	157
i+3,i	N(Leu <sup>12</sup> )	O(Aib <sup>9</sup> )	3.363	2.863	121
i+4,i	N(Aib <sup>13</sup> )	O(Aib <sup>9</sup> )	3.127	2.474	136
i+3,i	N(Leu <sup>15</sup> -ol)	O(Leu <sup>12</sup> )	2.960	2.173	164
Intermolekular					
Head-to-Tail	N(Ac-Trp <sup>1</sup> )	O(Gln <sup>14</sup> )	2.870	1.968	168
	N(Ala <sup>2</sup> )	O $^\epsilon$ (Gln <sup>14</sup> )	2.863	2.063	154
	N(Aib <sup>3</sup> )	O $^\epsilon$ (Gln <sup>14</sup> )	3.148	2.319	165
Side-by-Side	N $^\epsilon$ (Gln <sup>7</sup> )	O(Ac <sup>0</sup> )	3.156	2.192	149

	$N^{\epsilon}(\text{Gln}^{11})$	$O(\text{Aib}^{10})$	2.897	1.843	171
	$N^{\epsilon}(\text{Gln}^{14})$	$O^{\epsilon}(\text{Gln}^7)$	2.944	2.016	170
	$N^{\epsilon}(\text{Gln}^{14})$	$O^{\epsilon}(\text{Gln}^{11})$	2.942	2.039	177
Peptid-LM					
	$N^{\epsilon}(\text{Ac-Trp}^1)$	$O(\text{Wasser}^2)$	2.922	2.064	165
	$N^{\epsilon}(\text{Gln}^{11})$	$O(\text{Wasser}^1)$	3.041	2.268	162
LM-Peptid					
	$O(\text{Wasser}^1)$	$O(\text{Gln}^{11})$	2.766	1.846	160
	$O(\text{Wasser}^2)$	$O(\text{Leu}^{12})$	2.834	1.787	148
	$O(\text{Wasser}^2)$	$O(\text{Leu}^{15}\text{-ol})$	2.845	1.720	177
LM-LM	$O(\text{Wasser}^1)$	$N(\text{MeCN})$	3.059	2.405	157

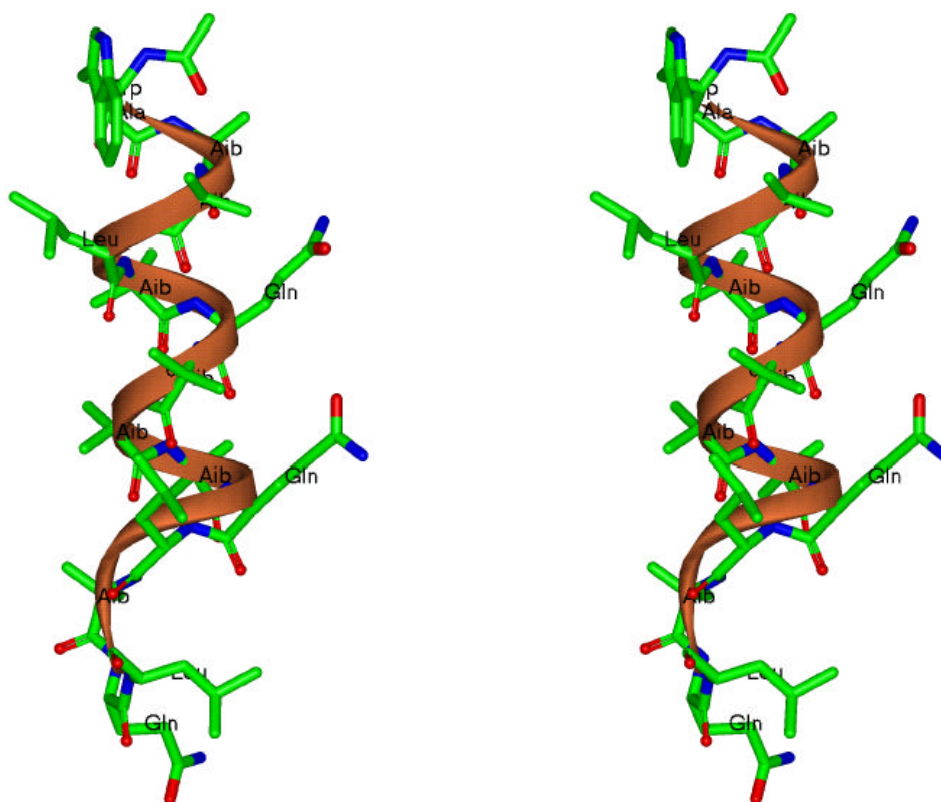


Abb. 4.8.2: Stereo view eines Ampullosporin A Moleküls. Es ist ein Schleifenmodell der Helix eingelegt. Wasserstoffatome sind nicht dargestellt.

## Helix

Ampullosporin hat eine helikale Grundstruktur (s. Abb. 4.8.2). Von Ac<sup>0</sup> bis zu Aib<sup>13</sup> finden wir das typische  $\alpha$ -helikale i, i+4-Muster, wobei die Wasserstoffbrücke Aib<sup>10</sup>/Aib<sup>6</sup> deutlich schwächer ist (vgl Tab. 4.8.1).

Zusätzlich gibt es vier i, i+3 H-Brückenpaare Gln<sup>7</sup>/Aib<sup>10</sup>, Aib<sup>8</sup>/Gln<sup>11</sup>, Aib<sup>9</sup>/Leu<sup>12</sup> und Leu<sup>12</sup>/Leu<sup>15</sup>-ol. Dieses Muster ist typisch für eine 3<sub>10</sub>-Helix. Das bedeutet, dass die Aminosäuren 10 – 12 gegabelte mit sowohl i, i+3 und i, i+4-Muster H-verbrückt sind. Hierbei muß beachtet werden, dass bei den ersten drei i, i+3 H-Brücken die H...A-Abstände relativ groß und die Winkel mit 120° relativ klein sind.

Die Carbonylgruppen von Aib<sup>10</sup> und Gln<sup>11</sup> sind nicht an intramolekularen Wasserstoffbrücken beteiligt.

Aus Tabelle 6.4.2 kann man entnehmen, dass alle Peptidbindungen *trans* konfiguriert sind. Die Torsionswinkel  $\phi$  und  $\psi$  der Aminosäuren 2-10 liegen zwischen -50° bis 72° bzw. -41° bis 52°. Die Torsionswinkel in einer  $\alpha$ -Helix liegen bei  $\phi = -63^\circ$  und  $\psi = -42^\circ$  und in einer 3<sub>10</sub>-Helix bei  $\phi = -57^\circ$  und  $\psi = -30^\circ$  [Barlow, 1988].

Auch die Torsionswinkel zeigen, dass im N-Terminus bis zu Aib<sup>10</sup> Ampullosporin A eine  $\alpha$ -Helix bildet. Die  $\psi$ -Winkel von Gln<sup>11</sup>, Leu<sup>12</sup> und Aib<sup>13</sup> sind deutlich kleiner und könnten als Zeichen für eine 3<sub>10</sub>-Helix gedeutet werden.

Die Aminosäuren 12– 15 wiederum erfüllen die Kriterien eines  $\beta$ -turn [Chou und Fasman, 1977].

Die Wasserstoffbrücken und die geometrischen Daten zeigen, dass vom N-Terminus etwa 2/3 des Moleküls eine rechtsgängige  $\alpha$ -Helix bilden. Das genaue Ende kann nicht festgelegt werden. Für den C-Terminus kann nicht entschieden werden, ob eine 3<sub>10</sub>-Helix oder ein  $\beta$ -turn vorliegt.

Aufgrund dieser Unsicherheiten wurde die Sekundärstruktur zusätzlich über das Programm PROMOTIF v. 3.01 [Hutchinson, 1996] bestimmt. PROMOTIF erkennt zehn Wasserstoffbrücken mit einem H...A-Abstand < 2,5 Å. Von Ac-Trp<sup>1</sup> bis Aib<sup>13</sup> erkennt es eine rechtsgängige  $\alpha$ -Helix. Die C-terminalen Aminosäuren Gln<sup>14</sup> und Leu<sup>15</sup>ol bilden einen  $\beta$ -turn.

Zwar wird PROMOTIF vornehmlich für die Strukturfestlegung von Proteinen, nicht von kleinen Peptiden benutzt. Trotzdem wird das Ergebnis als die Klassifizierung der Sekundärstruktur für Ampullosporin A angenommen, d. h. dass die schwache H-Brücke von Aib<sup>6</sup>/Aib<sup>10</sup> nicht den  $\alpha$ -helikalen Bereich unterbricht und dass die i, i+3-H-Brücken nicht für eine Klassifizierung als 3<sub>10</sub>-Helix ausreichen.



Dieses Ergebnisse liegt im Einklang mit den bisher veröffentlichten Daten von Sekundärstrukturen verschiedener Peptaibole. Denn obwohl Tri-, Tetra oder Pentapeptide mit mindestens einem Aib-Rest eine  $3_{10}$ -Helix bilden, finden sich in längeren Peptiden  $\alpha$ - oder gemischte  $3_{10}/\alpha$ -Helices [Karle et al., 1990].

Auch für die kürzlich veröffentlichte Sekundärstruktur des 18meren Peptaibols Trichotoxin wurde ein ähnliches Ergebnis wie für das Ampullosporin festgestellt [Chugh et al., 2002].

## 4.9. Circular dichroismus

### 4.9.1. Allgemeine Bemerkungen zum Circular dichroismus

[Snatzke, 1967; Snatzke, 1981; Bodansky, 1993]

Das Phänomen des Circular dichroismus rührt von der optischen Aktivität chiraler Verbindungen her. Meist wird nur der Drehwert  $\alpha$  (D-Linie des Natriums [589 nm]) einer optisch aktiven Substanz bestimmt. Der Drehwert ist aber nicht über den gesamten Wellenlängenbereich konstant. Mißt man daher über das gesamte Spektrum des Lichtes, erhält man die optische Rotationsdispersion (ORD). Gibt es in der gemessenen Substanz chromophore Gruppen, die bei bestimmten Wellenlängen das Licht absorbieren, erhält man anormale ORD-Kurven. Dieses Phänomen nennt man Cotton-Effekt.

Der CD nützt nun diese Absorption, die unterschiedlich stark je nach Polarisationsrichtung ist. Man strahlt sowohl links als auch rechts polarisiertes Licht in das Medium ein. Bei fehlender Absorption mißt man linear polarisiertes Licht. Wenn aber Licht absorbiert wird, d. h. ein Elektronenübergang auf ein höheres Energieniveau stattfindet, erfolgt eine unterschiedlich starke Auslöschung und man mißt kein linear polarisiertes Licht mehr sondern elliptisch polarisiertes Licht.

Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  ist also für beide Polarisationsrichtungen unterschiedliche und es ergibt

$$\epsilon_L - \epsilon_R = \Delta\epsilon$$

die dichroistische Änderung der Absorption (differential dichroic absorption) und daraus direkt die molare Ellipizität

$$\Theta = 3300 \times \Delta\epsilon.$$

Peptide haben zwei Quellen von Chiralität. Einmal die Händigkeit der Aminosäuren und Dissymmetrien in der Sekundärstruktur. Da der Einfluß der Dissymmetrien sehr viel größer

ist als der der Aminosäuren, gibt das CD-Spektrum Aufschluß auf die Sekundärstruktur von Peptiden. Helicale Strukturen von Peptiden haben drei besonders intensive Banden.

- Ein Minimum bei etwa 206 nm, den  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergang,
- ein weiteres Minimum bei ca. 222 nm durch den n- $\pi^*$ -Übergang
- schließlich bei 190 nm ein Maximum, das wieder aufgrund des Elektronenübergangs vom  $\pi$ - auf das  $\pi^*$ -Niveau entsteht [Kuruda et al, 2000].

Besonders gut lassen sich Änderungen der Konformation im Vergleich bestimmen, und der Einfluß der Variationen in der Sequenz der Ampullosporinanaloga und -derivate kann mit dem Ampullosporin A korreliert werden.

Da die Messung des CD in verdünnten Lösungen, die dem physiologischen Zustand nahe kommen, durchgeführt wird, hat er sich zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptiden neben der Röntgen-Kristallstrukturanalyse und der NMR als dritte Möglichkeit etabliert.

#### 4.9.2 Circular Dichroismus Untersuchung

CD-Spektren sind konzentrationsabhängig. Aus den gemessenen Spektren wird die molare Elliptizität nach der Formel

$$[\Theta] = [\Theta]_{\text{gemessen}} / 10nlc \quad (\text{Gl. 1})$$

berechnet. Dabei ist n ist die Anzahl der peptidischen Bindungen, l die Weglänge in cm und c die Konzentration in mol / g.

Für die verschiedenen Ampullosporin-Homologen ergeben sich daraus die abgebildeten Spektren (Abb. 4.9.2.1- 4.9.2.6).

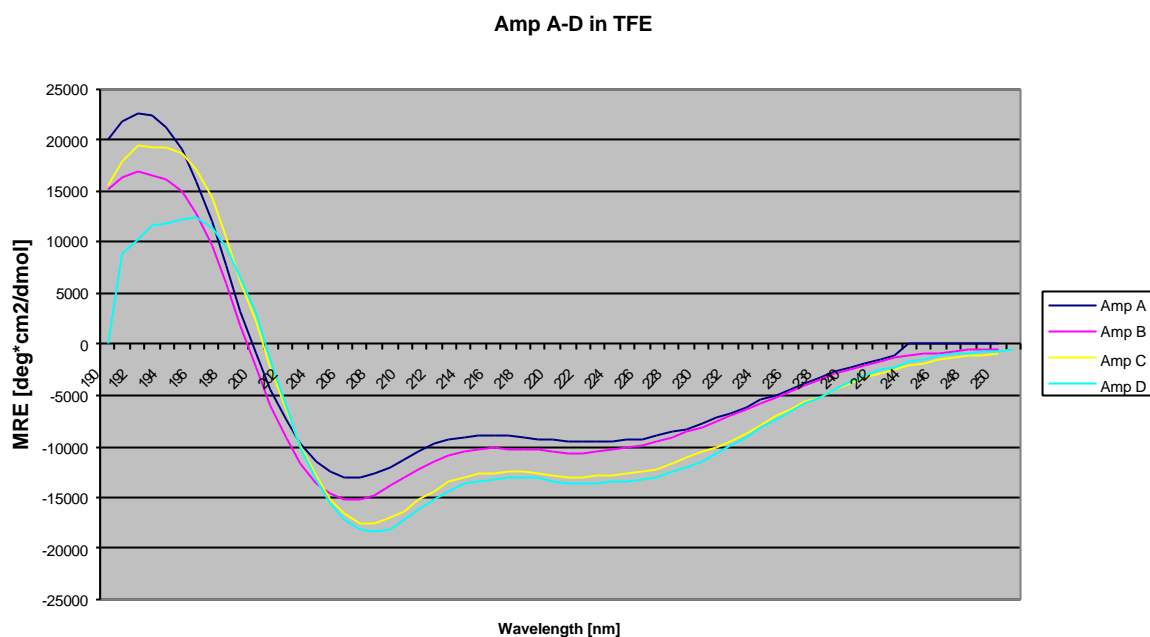
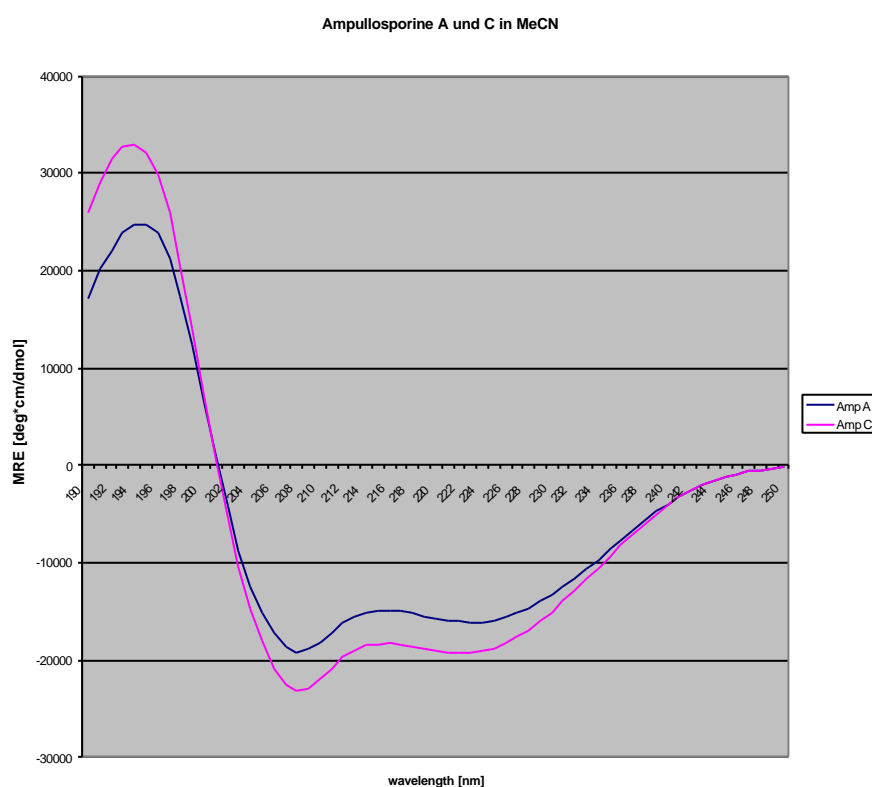


Abb.4.9.2.1: CD-Spektren der Ampullosporine A-D in TFE



4.9.2.2. CD-Spektren der Ampullosporine A und C in MeCN

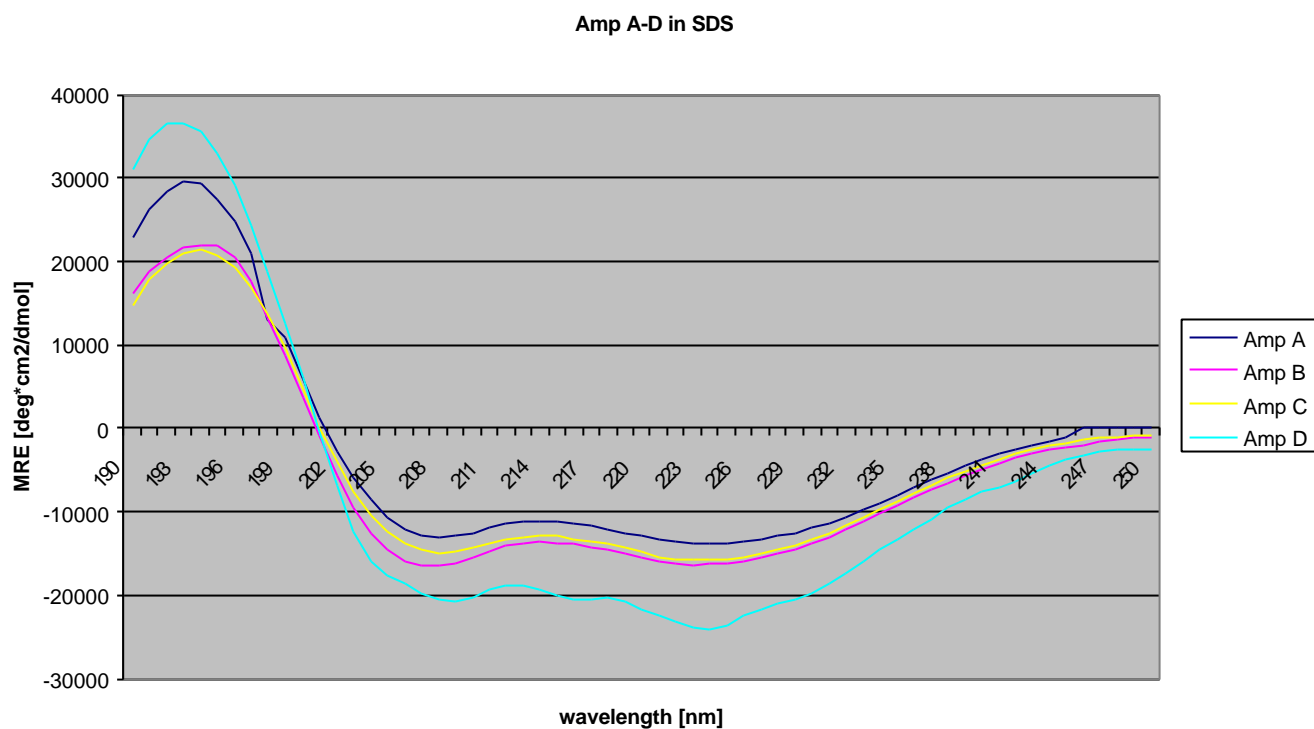


Abb. 4.9.2.3: CD-Spektren der Ampullosporine A-D in Pufferlösung mit SDS

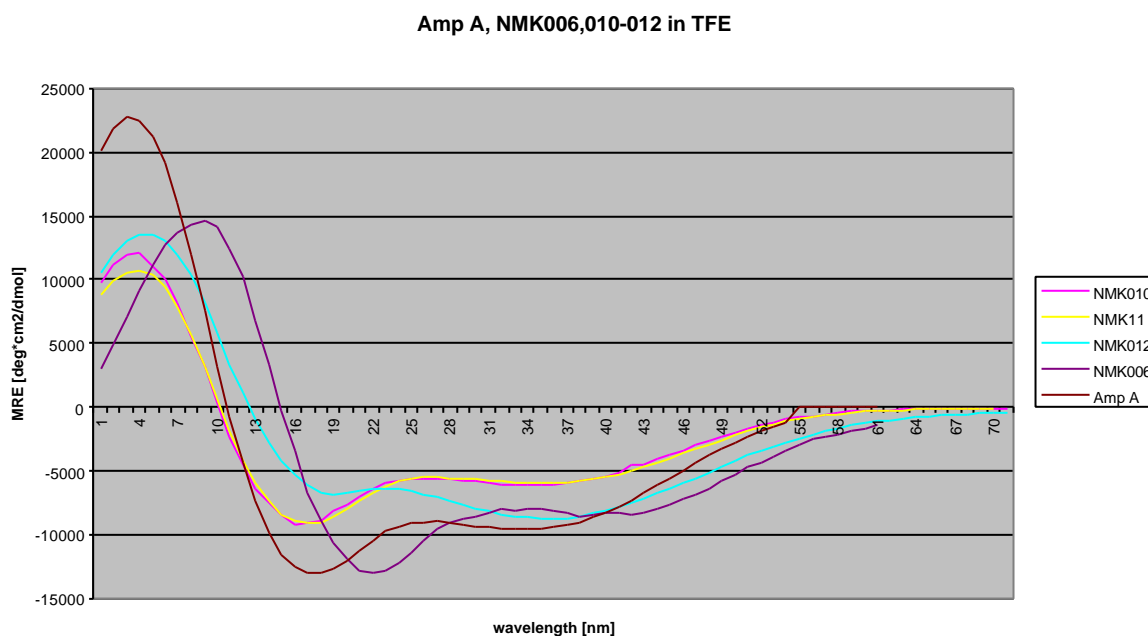


Abb. 4.9.2.4: CD-Spektren der Ampullosporin-Derivate in TFE

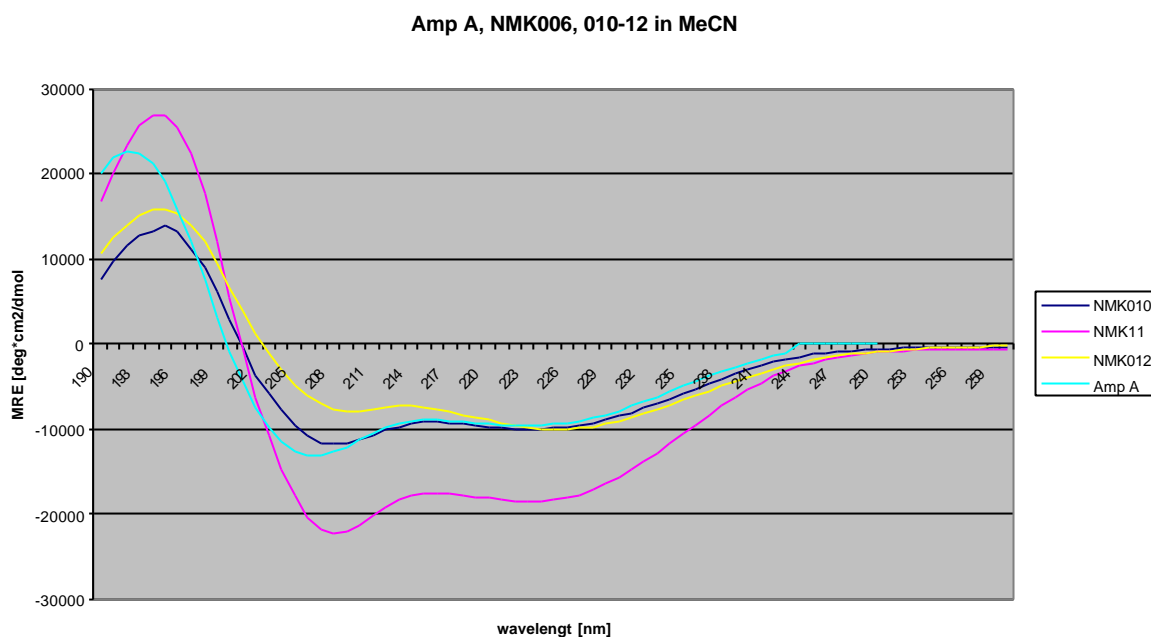


Abb. 4.9.2.5: CD-Spektren der Ampullosporin-Derivate in MeCN

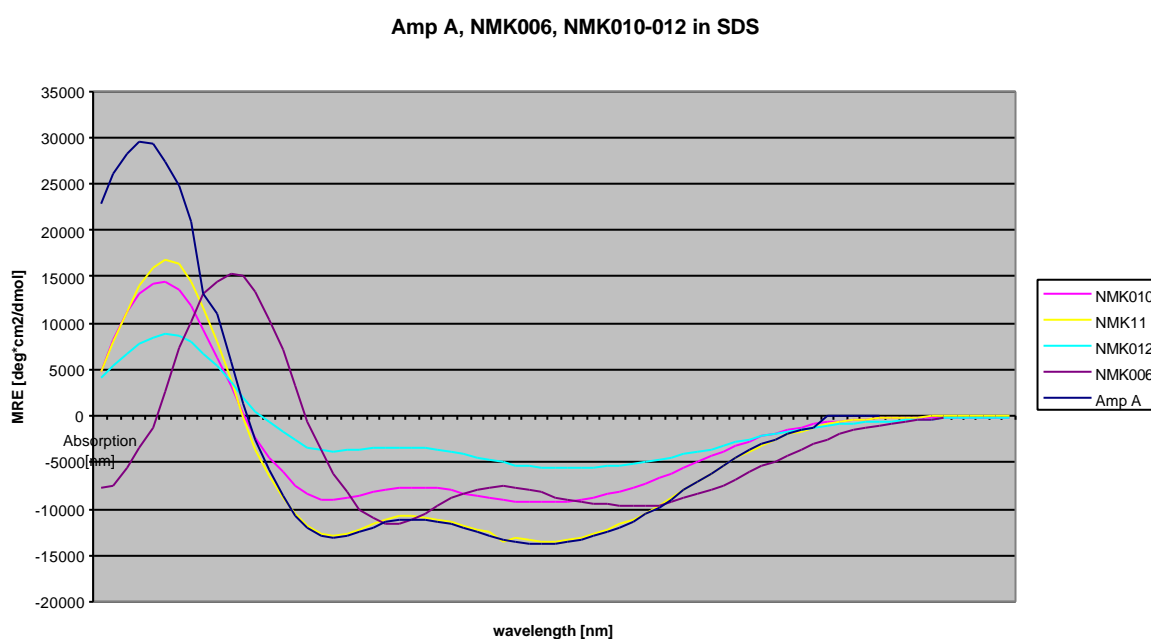


Abb. 4.9.2.6: CD-Spektren der Ampullosporin-Derivate in Pufferlösung mit SDS

Weiterhin lassen sich aus den Anregungsübergängen Strukturmerkmale anhand bestimmter Parameter berechnen. Dafür wird das CD-Spektrum des Ampullosporins A mit der Kristallstruktur als Referenz korreliert und die theoretische Elliptizität  $\Theta_H$  einer vollständigen Helix durch Umformen der Gleichung 2 berechnet.

$$\Theta_H = -21840 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$$

$f_H$  gibt den Anteil helikaler Strukturen im Peptid an (helix-coil-Modell, Rohl, 1997)

$$f_H = (\Theta_{n-\pi^*} - \Theta_C) / (\Theta_H - \Theta_C) \quad (\text{Gl. 2})$$

$\Theta_C$ , bzw  $\Theta_H$  ist die theoretische Elliptizität einer random coil, bzw einer vollständigen Helix-Konformation.  $\Theta_C$ , bzw  $\Theta_H$  können nach

$$\Theta_C = 2220 - 53T = 1054 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1} \quad (\text{Gl. 3})$$

$$\Theta_H = -21840 + ((7-m) \cdot (30800 + 21840) / 7) \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1} \quad (\text{Gl. 4})$$

berechnet werden, m: Anzahl der Aib im Molekül [Nguyen, 2003 (b)]. Für die Ampullosporine B-D ist  $\Theta_H = -23120$ .

dies ergibt die Anzahl n der helicalen Wasserstoffbückenbindungen im Peptid [Nguyen, 2003 (b)]

$$n_H = (N-3) \cdot f_H \quad (\text{Gl. 5})$$

Aus dem Verhältnis der Minima bei 204 und 222 nm läßt sich das Verhältnis von  $\alpha$ -bzw  $3_{10}$ -Helix in der Gesamthelix abschätzen (Nguyen, 2003 (b), Toniolo, 1996).

$$R = \Theta_{222} / \Theta_{204} \quad (\text{Gl. 6})$$

Die Elliptizität für  $\Theta_{n-\pi^*}$ ,  $\Theta_{\pi-\pi^*}$ -Übergänge und die Parameter für die Ampullosporine B-D und den Ampullosporinderivaten NMK006 – 012 sind in der Tabelle 4.9.2.1 angegeben.

Tab. 4.9.2.1: Molare Elliptizitäten und Parameter aus den CD-Spektren der Ampullosporine B-D und NMK006-012.

	$\Theta_{n-\pi^*}$	$\Theta_{\pi-\pi^*}$	R	$f_H$	$n_H$
Ampullosporin A					
in TFE	-13060	-9540	0,73	0,46	5,6
in SDS	-13150	-13830	1,05	0,65	7,8
in MeCN	-16120	-13380	0,83	0,75	9,0
Ampullosporin B					
in TFE	-12920	-9690	0,75	0,44	5,3
in SDS	-14630	-14710	1,01	0,65	7,8
Ampullosporin C					
in TFE	-16660	-12780	0,77	0,57	6,9
in SDS	-15600	-15890	1,02	0,70	8,4
in MeCN	-23140	-19230	0,83	0,84	10,0
Ampullosporin D					
in TFE	-16430	-12150	0,75	0,55	6,6
in SDS	-14770	-15610	1,06	0,69	8,3
NMK006					
in TFE	-13400	-9700	0,70	0,48	5,8
in SDS	-11620	-9720	0,84	0,52	5,7
in MeCN	-18110	-13400	0,74	0,65	7,8
NMK010					
in TFE	-9160	-6080	0,66	0,34	4,1
in SDS	-9120	-9350	1,03	0,50	6,0
in MeCN	-11690	-9970	0,85	0,53	6,4
NMK011					
in TFE	-9100	-5590	0,61	0,32	3,8
in SDS	-12830	-13510	1,05	0,70	8,5
in MeCN	-22340	-18610	0,83	0,95	11,4
NMK012					
in TFE	-6780	-8720	1,23	0,47	5,6
in SDS	-3850	-5650	1,47	0,28	3,3
in MeCN	-7840	-10020	1,28	0,53	6,4

Die Aussagekraft von CD-Spektren ist abhängig von der Referenz. Ampullosporin ist aufgrund des hohen Anteil der achiralen Aminosäure Aib wenig mit anderen Peptiden vergleichbar. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur des Ampullosporins A existiert jedoch eine aussagekräftige Referenz für die Auswertung der CD-Spektren.

Dafür wurde in MeCN, da Ampullosporin aus diesem Lösungsmittel umkristallisiert worden war, gemessen und dieses Spektrum mit den Daten zur Sekundärstruktur gleichgesetzt. Aufgrund der neun intramolekularen H-Brücken ist  $f_H = 0,75$  gesetzt und es können daraus die anderen Parameter abgeleitet werden.

Zusätzlich wurden noch CD-Spektren in TFE aufgenommen. Fluoralkohole gelten als Induktoren von Helices [Hong et al., 1999; Gast et al., 2001]. Darüber hinaus ist TFE deutlich polarer als MeCN.

SDS ist ein mizellenbildendes Tensid. Mizellen können mit ihrer hydrophilen Außen- und hydrophoben Innenseite als ein sehr einfaches Membranmodell gesehen werden. CD-Spektren in SDS geben daher die Verhältnisse des Ampullosporins in der Membran besser wieder als die der beiden anderen Lösungsmittel [Mao, 1982; Blondelle, 1999].

Das Spektrum in MeCN von Ampullosporin A zeigt das typische Bild für eine  $\alpha$ -Helix [Manning, 1991]. Der R-Wert beträgt 0,83.  $R < 1$  ist ein Zeichen für eine  $\alpha$ -Helix, während deutlich kleinere Werte um 0,4 für  $3_{10}$ -Helices typisch sind [Toniolo et al., 1996]. Aus der Kristallstruktur ist bekannt, dass Ampullosporin überwiegend  $\alpha$ -Helix ausbildet. Das Ergebnis der CD-Spektroskopie stimmt damit überein.

In TFE ist  $R=0,73$  erniedrigt, zusätzlich ist die Intensität der Minima abgeschwächt einhergehend mit einer Blauverschiebung. Nach den Arbeiten von Woody und Chang [1995; 1978] sind dies Zeichen eines  $\beta$ -turns (hierzu gehört auch die  $3_{10}$ -Helix). Insgesamt kann man daraus den Schluß ziehen, dass Ampullosporin in TFE die Konformation ändert und zwar zu mehr  $3_{10}$ -helikalem Charakter.

Weiterhin ist der Anteil helikaler Strukturen in TFE deutlich niedriger als in MeCN. Es bildet nur sechs Wasserstoffbrücken aus. Diese gehören zu einer Helix von Ac0 bis Leu5. Aib 6, das auch im Kristall keine intramolekulare H-Brücke ausbildet, kann hier der Start einer anderen Struktur sein. Der Fluoralkohol induziert in diesem Fall nicht die Helixbildung.

Das Spektrum in SDS weicht besonderes in der Parameter  $R = 1$  von den obigen Lösungsmitteln ab. Solch ein Wert deutet auf transmembranäre Helices hin [Park, 1992]. R-Werte  $> 1$  werden auch oft als Indikatoren für Helixassoziationen angegeben [Hara 2001]. Auch hier könnten die drei Glutaminseitenketten, wie in der Kristallstruktur, intermolekulare Wasserstoffbrücken ausbilden. Ein ähnliches Phänomen konnte auch von Zhou [2001] an



Polyleucin in transmembranen Helices gezeigt werden. Insgesamt entspricht das Spektrum für Ampullosporin A in SDS dem anderer Peptaibole wie Alamethicin und Antiamoebin in Detergentien [Cascio et al., 1988; Snook, 1998].

Von einigen Unterschieden abgesehen verhalten sich die natürliche Ampullosporin B-D ähnlich zum Ampullosporin A. Wobei die Ampullosporine C und D gering höhere helikale Anteile aufweisen (s.  $f_H$  in Tab. 4.9.2.1).

Die CD-Spektren von NMK006 in MeCN und TFE sind mit Ampullosporin A vergleichbar. In SDS aber ist das Verhältnis  $\Theta_{222} / \Theta_{204} < 1$  und der helikale Anteil nimmt nicht im Vergleich zu TFE zu. Tryptophan und Acetylgruppe sind also für die Assoziation in SDS-Mizellen und die Helixbildung von großer Bedeutung.

Die beiden am C-Terminus modifizierten Derivate NMK010 und 011 ergeben zum Ampullosporin A vergleichbare CD-Spektren und Parameter. Änderungen an diesem Ende des Peptids haben wenig Einfluß auf die Sekundärstruktur.

NMK012 verhält sich fast durchweg anders. Zwar entsprechen  $f_H$  und  $n_H$  in TFE dem Ampullosporin, in den anderen Lösungsmitteln ist aber die Helix deutlich verkürzt, in SDS auf nur noch drei intermolekulare Wasserstoffbrücken. Die R-Werte liegen in allen drei Lösungsmitteln deutlich über 1. Die Parameter zeigen, dass sich die Struktur des Ampullosporins A durch die Methylierung der Glutaminseitenketten signifikant ändert.

## **4.10. Biologische Aktivität der Substanzen**

### **4.10.1 Induktion der Pilzmorphogenese („Phomatest“)**

Da durch den „Phomatest“ lediglich Differenzierung der Morphologie der Hyphen des Pilzes *P. destructiva* erfasst werden, sind nur qualitative Aussagen im Vergleich zu Standardsubstanzen wie Cyclosporin A oder Ampullosporin A möglich. Cyclosporin A wurde als Kontrolle eingesetzt, um zu überprüfen, ob das Wachstum und die Änderung der Morphogenese des Pilzes auf der Testplatte normal verlaufen. Ampullosporin A diente als Standard zur Ermittlung der Aktivität der Proben. Die Aktivität wurde in stark, d.h. ähnlich zum Ampullosporin A, schwach und inaktiv eingeteilt.

Die Ampullosporine B, D, NMK010 und NMK011 hatten eine zum Ampullosporin vergleichbare Aktivität; Ampullosporin C wirkte schwächer und die Substanzen NMK006 und 012 waren inaktiv (s. Tab. 4.10.1.1 und Abb. 4.10.1.1).

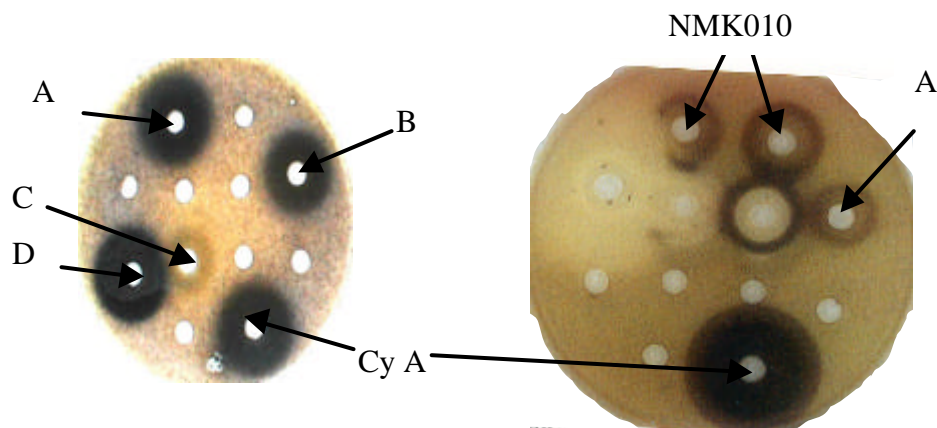


Abb. 4.10.1.1: Beispiele für den Phomaeffect. Links die Ampullosporine A-D, rechts NMK010 (Halos 1 und 2, Halo 6 Amp. A).

Tab. 4.10.1.1: Aktivität der untersuchten Substanzen, xx: stark, x: schwach, n.a.: nicht aktiv

Substanz	Pigmentinduktion	Hypothermie
Ampullosporin A	xx	xx
Ampullosporin B	xx	xx
Ampullosporin C	x	x
Ampullosporin D	xx	x
NMK006	n.a.	n.a.
NMK010	xx	xx
NMK011	xx	xxx
NMK012	n.a.	n.a.

#### 4.10.2 Hypothermietest

Substanzen, welche die Pigmentbildung induzieren, sind oft neuroleptisch aktiv, während inaktive Substanzen keine neuroleptische Wirkung mehr aufweisen sollten. Diese Hypothese wurde bei der Messung der Absenkung der Körpertemperatur und der Überprüfung der lokomotorischen Aktivität überprüft. Es konnten die Ergebnisse aus dem mikrobiellen Vortest bestätigt werden. Ampullosporin D war in diesem Assay schwächer und NMK011 stärker wirksam als Ampullosporin A (s. Tab 4.10.1.1).

Es konnte also im Trend die Beobachtung von Nguyen [2003 (a)] bestätigt werden, dass der Hypothermietest empfindlicher als der Phomatest ist.

Da aber der Phomatest einfach durchzuführen ist und nicht den gesetzlichen Einschränkungen eines Tierversuches unterliegt, hat er sich als relativ sichere Methode, die Trends in der neuroleptischen Aktivität anzeigen kann, etabliert.

Weiterhin wurde festgestellt, dass das N-terminale Tryptophan für die biologische Aktivität essentiell ist. Hierzu hatte Nguyen [2003 (a)] weitergehende Untersuchungen durchgeführt und konnte bestätigen, dass Tryptophan oder ein adäquater aromatischer Ersatz notwendig für die biologische Aktivität ist.

Der Austausch von Aib durch Alanin kann zu Änderungen in der Aktivität führen. Dies ist abhängig von der Position des Austausches. Hier sind die Positionen 9 und 10 empfindlicher als Position 8, bei der weder im Phomatest noch im Hypothermietest eine Änderung im Vergleich zum Ampullosporin A festgestellt werden konnte.

Veränderungen an der Alkoholgruppe am C-Terminus haben kaum Einfluß auf die biologische Wirksamkeit des Ampullosporins und können so als mögliche Angriffspunkte für funktionelle Modifizierungen, z. B. zur Änderung der Polarität, dienen.

#### 4.10.3 Rezeptorbindung des Ampullosporins

Bei *in vitro*-Untersuchungen des Ampullosporins mit einem Radioligand-Bindungsassay konnten Lehmann und Mitarbeiter feststellen, dass Ampullosporin A nicht signifikant an den Dopaminrezeptoren D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> bindet [Lehmann, 2002]. Die neuroleptische Aktivität kann also nicht auf eine Blockade der dopaminergen Rezeptoren D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> zurückgeführt werden.

Zu dem gleichen Ergebnis kommen Greksch und Mitarbeiter.

Darüber hinaus wurde der Einfluß des Ampullosporins auf Ratten mit Ketamin induzierten Psychosen, die mit dem NMDA-Rezeptor korrelieren, untersucht. Die Autoren konnten eine Affinität des Ampullosporins zum glutaminergen Rezeptor *in vivo* nachweisen [Greksch, 2003]. Dieser Rezeptor bildet, wie in Kap. 1.3. dargestellt, Ionenkanäle aus.

## 4.11. Membranaktivität

### 4.11.1 Allgemeine Bemerkungen zur Porenbildung

Die biologischen Aktivitäten der Peptaibole werden meist auf deren membranmodifizierenden Eigenschaften zurückgeführt (s. Kap. 1.2.). Auch Ampullosporin A wirkt membranmodifizierend und bildet Poren oder Kanäle aus [Grigoriev, 1997].

Eine Lipid-Doppelschicht (s. Abb. 4.11.1) als Modell einer natürlichen Membran besteht aus drei Regionen, dem lipophilen Kern, den Kopfgruppen am hydrophoben / hydrophilen Interface und dem hydrophilen Teil. Der für Wassermoleküle und Ionen undurchlässige Kern hat eine Kettenlänge von 14 – 22 C-Atomen und eine Tiefe von 20 – 29 Å [Popot et al., 2000; Duclohier et al., 2001 (b)]. Die beiden Kopfgruppen bieten den Proteinen zahlreiche Möglichkeiten nichtkovalenter Interaktionen [Killian et al., 2000].

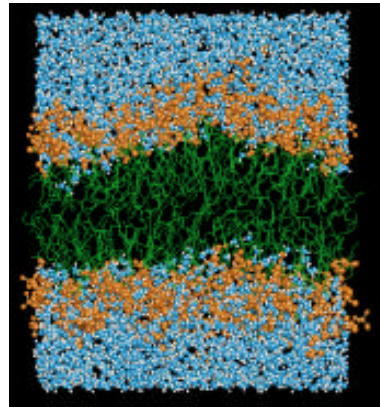


Abb. 4.11.1: Modell eines hydratisierten Bilayers. Die C-Ketten (grün) bilden die etwa 30 Å dicke ungeordnete Hydrocarbonschicht, die hier orange hervorgehobenen Punkte stellen die Phospholipidschicht dar, sie ist etwa je 15 Å groß. aus Popot und Engelmann, 2000

Für die Porenbildung von Peptaibolen werden zwei Modelle vorgeschlagen.

Das „Faßdauben“- oder „barrel stave“-Modell beschreibt die Pore oder den Kanal in der Membran als Faß, wobei die Peptaibolmoleküle die Dauben sind. Die hydrophoben Seiten der amphipatischen Moleküle interagieren mit dem lipophilen Membrankern, und die hydrophilen Seiten öffnen die Pore für Wassermoleküle und Ionen. Zur Ausbildung eines Kanals müssen folgende Bedingungen erfüllt sein:

- die Monomere binden als  $\alpha$ -Helices auf der Membran,
- Monomere assoziieren auch schon bei geringer Konzentration auf der Membran (dies ist wichtig, da es für ein Monomer energetisch ungünstig ist in die Membran zu inserieren),
- sie inserieren als Assoziat in die Membran, und nehmen

- weitere Monomere in die Pore auf, um sie zu vergrößern und zu stabilisieren (s. Abb. 4.11.2).[Müller, 1975; Ehrenstein et al., 1977; Shai, 1999; Sansom, 1993].

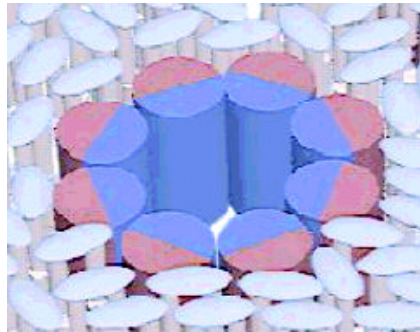


Abb. 4.11.2: Modell eines „barrel-stave“-Kanals von Alamethicin. Auf der Innenseite der hydrophobe Part des Moleküls (blau), außen die lipophile Seite (rot). aus Huang, 2000

Das zweite Modell, „carpet“ oder „Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) model“, geht von einem anderen Ansatz aus. Die membranaktiven Moleküle interagieren mit der lipophilen Kopfgruppe und müssen nicht in das Membranzentrum inserieren. Auch assoziieren die Monomere sich nicht so, dass ihre hydrophilen Seiten sich im Gegensatz zum obigen Modell gegenüber stehen, sondern die Porenbildung verläuft so, dass

1. sich die Moleküle an die Membranoberfläche, die Phospholipid-Kopfgruppen, binden,
2. sich die hydrophilen Seiten an den Phospholipidgruppen anordnen,
3. eine Neuausrichtung der Moleküle erfolgt, so dass die hydrophoben Seiten der Substanzen mit den hydrophoben Kern der Membran interagiert und
4. es schließlich zum Aufbrechen der Membranstruktur und Auflösen der Membran kommt (s. Abb. 4.11.3).

Zwischen Schritt drei und vier ist ein Übergang möglich, bei dem Poren vorhanden sind [Shai, 1999]. Für die Ausbildung der Poren ist eine ausreichend hohe Konzentration an Monomeren auf der Membran notwendig.

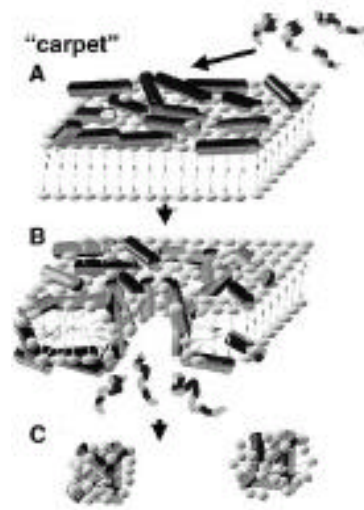


Abb. 4.11.3: Modell des Carpet-Mechanismus. Bindung der Peptide an der Membranoberfläche, die hydrophile Seite zeigt zur Wasserphase (Schritt A), bei Überschreiten der Grenzkonzentration werden Poren gebildet (Schritt B), die dann zum Kollaps der Membran führen können (Schritt 3). aus Shai und Oren, 2001

#### 4.11.2 Messung der Membranaktivität

Die experimentellen Untersuchungen der membranmodifizierenden Eigenschaften der Analoga und Derivate des Ampullosporins sind in dem Konzentrationsbereich des Ampullosporins A durchgeführt worden. Die natürlichen Analoga und die Derivate NMK010 und NMK011 führen zu einer erhöhten Leitfähigkeit und sind somit aktiv. Die beiden anderen Derivate NMK006 und NMK012 zeigen keine Erhöhung der Leitfähigkeit (s. Abb. 4.11.5). Sie bilden keine Poren in der BLM aus und haben daher keine membranmodifizierende Eigenschaften.

Um die Veränderung der Leitfähigkeit vergleichen zu können, wurde bei einer definierten Konzentration von  $0,5 \mu\text{g} / \text{mL}$  die Leitfähigkeit gemessen. Als Vergleichsubstanz diente neben dem Ampullosporin A auch das gut untersuchte Alamethicin (Konz.  $0,25 \mu\text{g} / \text{mL}$ ). In Abb. 4.11.4 ist das Ergebnis dargestellt. Nur das Ampullosporin C ist signifikant schwächer wirksam als das Ampullosporin A. Ampullosporin D ist nur unwesentlich schwächer und NMK011 stärker wirksam als Ampullosporin A.

Alamethicin ist um Größenordnungen (50.000) aktiver als die Ampullosporine (nicht dargestellt).

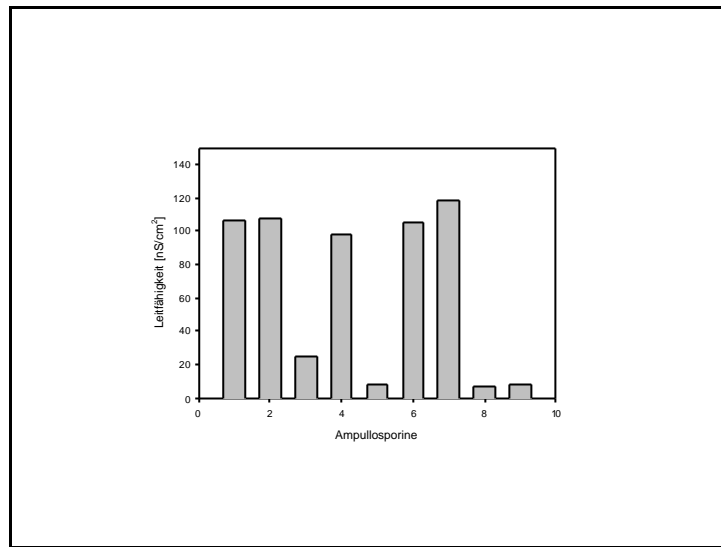
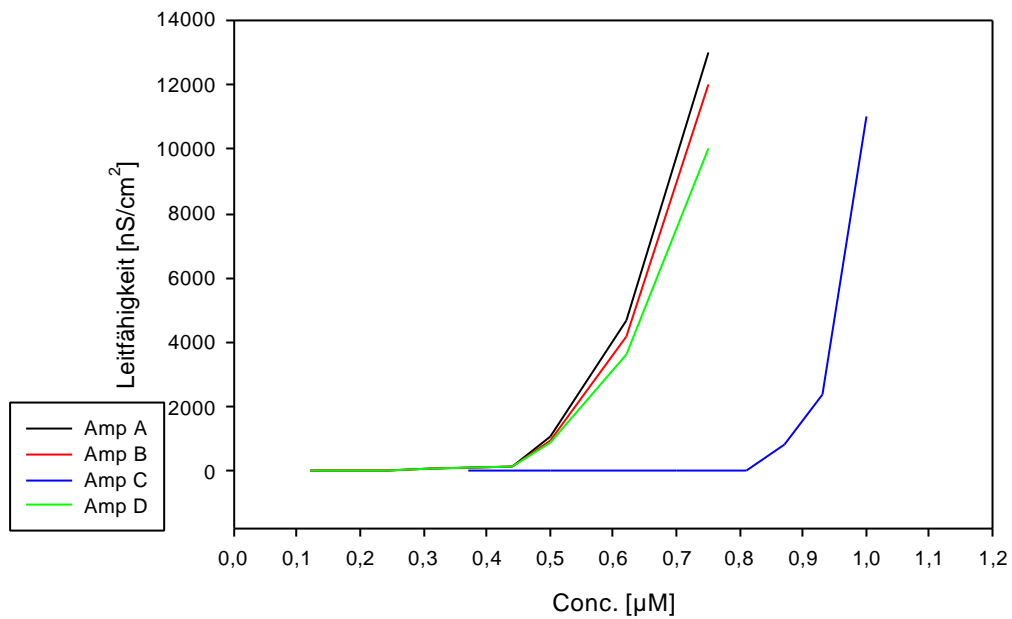


Abb. 4.11.4: Vergleich der Porenbildung der Ampullosporin-Analoga. 1: Amp A, 2: Amp B, 3: Amp C, 4: Amp D, 5: NMK006, 6: NMK010, 7: NMK011, 8: NMK012, 9: Leerwert

### Ionenleitfähigkeit der Ampullosporine A-D



### Leitfähigkeit der Ampullosporinderivate

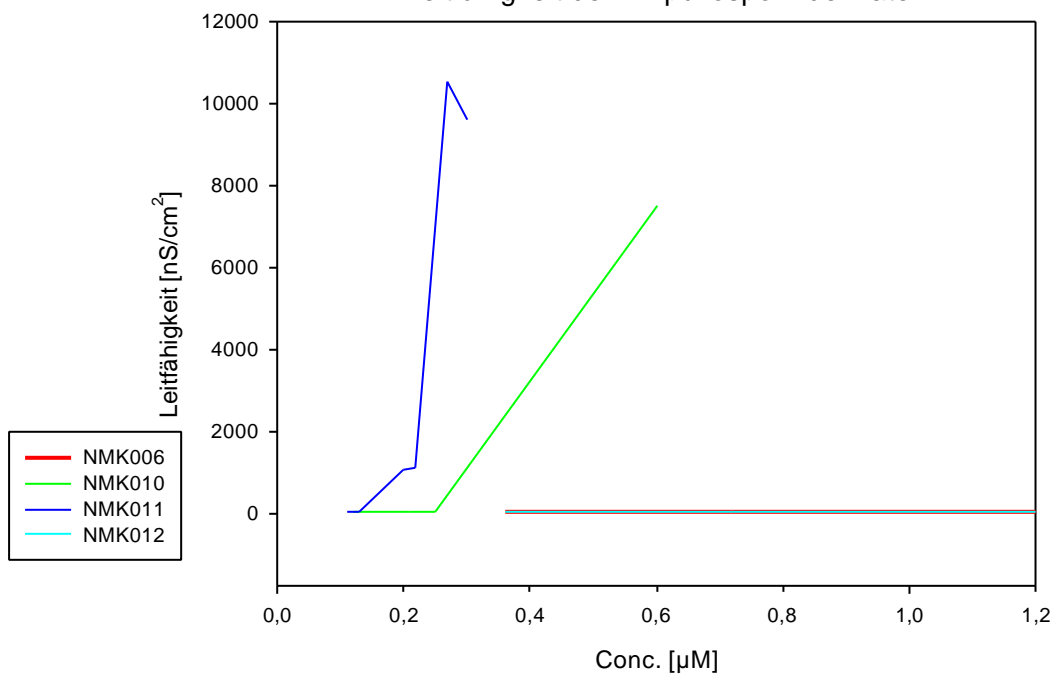


Abb. 4.11.5: Änderung der Leitfähigkeit der BLM bei unterschiedlichen Konzentrationen der Analoga und Derivate. Die Derivate sind in der Abbildung nicht direkt mit Ampullosporin A vergleichbar, da sie nicht parallel aufgenommen wurden.



#### 4.11.3. Modell der Ampullosporinporenbildung

Ampullosporin ist ein amphipatisches Molekül. Der hydrophile Teil wird von den Carboxylamidgruppen der Glutaminseitenketten und den Carbonyl-Sauerstoffen der Aib<sup>10</sup> und des Gln<sup>11</sup>, die nicht in die Helix integriert sind, gebildet. Ihnen gegenüber stehen die raumfüllenden unpolaren Seitenketten des Ac-Trp<sup>1</sup>, Leu<sup>5</sup>, Leu<sup>12</sup> und Leu<sup>15</sup>-ol (s. Kap. 4.8.). Die amphipatische Eigenschaft ist eine Voraussetzung zur Porenbildung [Tieleman et al., 1999].

Im ersten Schritt können Ampullosporin A-Monomere sich an den Kopfgruppen mit den polaren Gruppen binden. Sie liegen dann parallel zur Membran, und bei einer hinreichenden Konzentration an Monomeren können sie inserieren und gleichzeitig Aggregate bilden.

Mit Hilfe der Röntgenkristall-Strukturanalyse (Kap. 4.8.) konnte gezeigt werden, dass im Molekül einige Donoren und Akzeptoren für H-Brücken nicht an der Helixbildung beteiligt sind sondern für intermolekulare Bindungen, die die Aggregate stabilisieren, zur Verfügung stehen. Beim Anlegen einer Spannung richten die Moleküle sich entlang des Dipols aus und das Gleichgewicht zwischen Monomeren und Aggregaten wird aufgrund von spannungsabhängigen Konformationsänderungen zu den letzteren verschoben; man misst eine Erhöhung der Leitfähigkeit [Wooley et al., 1994].

Im Kristall hat die Ampullosporinhelix eine Länge von 20,2 Å. Wie oben gesagt, hat eine BLM eine Tiefe von etwa 30 Å, so dass ein Molekül schwerlich eine Membran ganz durchdringen kann. Für kurze Petaibole wie das Trichogin A IV und für Fragmente des Alamethicins ist eine Dimerisierung beschrieben [Menestrina et al., 1986; Toniolo et al., 1996]. Weiterhin ist bekannt, dass Peptaibole ihre Geometrie in der Membran ändern [Tieleman et al., 1999; Cascio et al., 1988].

Im Rahmen der CD-Untersuchung konnte gezeigt werden, dass auch Ampullosporin in verschiedenen Lösungsmitteln seine Konformation ändern kann. Ausführlich ist dies von Nguyen gezeigt worden [2003 (a) und (b)]. Eine Änderung vom  $\alpha$ -helikalen Motiv hin zu einer  $3_{10}$ -Helix verlängert das Molekül. Eine reine  $3_{10}$ -Helix des Ampullosporins hätte eine Länge von ca. 27 Å. Darüber hinaus können auch an der BLM Veränderungen, wie der "membrane thinning effect" [Heller et al., 1997; 2000], auftreten, so dass die gesamte Tiefe der Membran von einem Ampullosporinmolekül überbrückt werden kann.

#### 4.12 Sekundärstruktur, Porenbildung und biologische Aktivität

Tab. 4.12.1: Vergleich der Porenbildung und der CD-Spektren mit den biologischen Tests der Ampullosporin Analoga. 2: starke Aktivität, 1: schwache Aktivität, 0: keine Aktivität; +: CD-Spektrum ähnlich zum Ampullosporin A, -: Unterschiede im CD-Spektrum zum Ampullosporin A.

Analogon	Porenbildung	CD-Spektrum	Phoma	Hypothermie
A	2	+	2	2
B	2	+	2	2
C	1	+	1	1
D	2	+	2	1
NMK006	0	-	0	0
NMK010	2	+	2	2
NMK011	2	+	2	2
NMK012	0	-	0	0

Zwischen der Porenbildung und den CD-Spektren mit der Pigmentinduktion bei *P. destructiva* kann eine Korrelation festgestellt werden (s.Tab. 4.11.3.1).

Als Grund für die Pigmentinduktion kann die Bildung von Poren, durch die Ionen und Nährstoffe entlang des Gradienten diffundieren, diskutiert werden. Der Organismus gerät unter Stress und es kommt zu einer vorzeitigen Alterung von *P. destructiva*. Dieser Prozeß geht einher mit Melanineinlagerung in den Hyphen, und es bilden sich Pyknidien, in denen Pykno-sporen gebildet werden (s. Abb. 4.11.3.1).

Alamethicin wirkt so stark auf die Membranen des Organismus, dass dieser abgetötet wird. Es kommt hier also auf den moderaten Effekt des Ampullosporins an.



Abb. 4.12.1.: Mikroskopische Aufnahme von *P. destructiva*. Man sieht links eine junge Hyphe, rechts ältere Hyphen mit eingelagertem Melanin und einer Pyknidie in der Mitte. Foto: H. Friedrich

Auch bei der Hypothermie an Mäusen kann eine Korrelation mit der Membranaktivität festgestellt werden. Somit scheint die membranmodifizierende Eigenschaft auch hier eine Voraussetzung darzustellen. Da dieser Test Rückschlüsse auf die neuroleptische Potenz der Ampullosporine zuläßt, kann geschlußfolgert werden, dass auch die neuroleptische Wirkung auf dieser Eigenschaft beruht. Ob aber zusätzlich weitere Bedingungen oder ein anderer Mechanismus, wie Rezeptorbindung, erfüllt sein müssen, muß Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

## 5. Literaturverzeichnis

- Ammer** H, Besl H, Vilsmeier S. Der flaschenförmige Goldschimmel, *S. ampullosporum*, ein thermophiler Parasit an Pilzfruchtkörpern der Boletales. Zeitschr. f. Mycologie, 1997; 63: 127-189
- Anonymous.** ACD/LABS Vers. 4.01, 1999 Advanced Chemistry Development Inc. Toronto
- Anonymous.** COLLECT, Data Collection Software; Nonius B.V., Netherlands, 1998.
- Anonymous:** European Pharmacopoeia 3<sup>d</sup> Ed., Deutscher Apothekerverlag Stuttgart, 1997, pp. 113-118
- Arora** D., Elander R., Mukerji K., Handbook of applied Mycology, Vol 4, Marcel Dekker Verlag, New York, 1992; S. 3
- Auvin-Guette** C, Rebuffat S, Prigent Y, Bodo B. Trichogin A IV, an 11-residue lipopeptaibol from *Trichoderma longibrachiatum*. J Am Chem Soc 1992; 114: 2170–2174.
- Auvin-Guette** C, Rebuffat S, Vuidepot I, Massias M, Bodo B. Structural elucidation of trikonigins KA and KB, peptaibols from *Trichoderma koningii*. J Chem Soc Perkin Trans I 1993: 249–255.
- Barlow** DJ, Thornton IM. Helix Geometry in Proteins. J. Mol. Biol. 1988; 201: 601-618
- Basinath** M, Ramabadran K. Bioscreening technique for antipsychotic activity. In Drug Bioscreening. Fundamentals of Drug Evaluation Techniques in Pharmacology (Ed. Thompson EB) VCH, Weinheim 1990, 33-52
- Benett**, JV, Brodie JL, Benner EJ, & Kirby WMM. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. Appl. Micr. 1966; 14: 170-177
- Berg** A, Ritzau M, Ihn W, Schlegel B, Fleck WF, Heinze S, Grafe U. Isolation and structure of bergofungin, a new antifungal peptaibol from *Emericellopsis donezkii* HKI 0059. J Antibiot. 1996; 49: 817-20.
- Beven** L, Duval D, Rebuffat S, Ridell FG, Bodo B, Wroblewski H. Membrane permeabilisation and antimycoplasmatic activity of the 18-residue peptaibols trichorzins PA. Biochim Biophys. Acta, 1998;1372: 78-90
- Beyer**, Walter. Lehrbuch der Organischen Chemie, 22. S. Hirzel Verlag, Stuttgart 22 Aufl., S. 256
- Biemann** K. Mass spectrometry of peptides and proteins. Annu Rev Biochem 1992; 61: 977-1010.

- Bleich S**, Bleich K, Wiltfang J, Maler JM und Kornhuber J. Glutamanerge Neurotransmission bei Schizophrenien. *Fortschr Neurol Psychiat.* 2001; SH2: 56-61
- Blondelle SE**, Lohner K, Aguilar MI. Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *BBA.* 1999; **1462**: 89-108].
- Bodansky**, M. *Peptide Chemistry, A Practical Textbook*, 2nd ed. Springer Verlag, Berlin, 1993
- Bolitt V**, Mioskowski C. Direct Preparation of 2-Deoxy-D-glucopyranosides from Glucals without Ferrier rearrangement. *J. Org. Chem.* 1990; 55: 5812-13
- Bondy B**. Das Krankheitsbild der Schizophrenie. *Pharm. uns. Zeit* 2002; 31: 530-536
- Brueckner H**. & Przybylski M., *J. Chrom.* 296 (1984) 263 – 275
- Cane DE**. A special thematic issue on polyketide and nonribosomal polypeptide biosynthesis. *Chem. Rev.* 1997; 97: 2463-2706
- Cane DE**, Walsh CT, Khosla C. Harnessing the biosynthetic code: Combinations, permutations, and mutations. *Science* 1998; 282: 63-68
- Cascio M**, Wallace BA. Conformation of alamethicin in phospholipid vesicles: implications for insertion models. *Prot. Struct. Func. Gen* 1988; 4: 89-98.
- Chang CT**, Wu CSC, Yang JT. Circular dichroism analysis of protein conformation: inclusion of  $\beta$ -turns. *Anal. Biochem* 1978; 91: 13-31.
- Chikanishi T**, Hasumi K, Harada T, Kawasaki N, Endo A. Clonostachin, a novel peptaibol that inhibits platelet aggregation. *J Antibiot.* 1997;50(2):105-10.
- Chou PY**, Fasman GD.  $\beta$ -turns in proteins. *J. Mol. Biol.* 1977; 115: 135-177
- Chugh JK**, Brückner H, Wallace BA. Model for a Helical Bundle Channel Based on the High-Resolution Crystal Structure of Trichotoxin A50E. *Biochemistry* 2002; 41: 12934-12941.
- Chugh, J.K.**, Wallace, B.A. Peptaibols: models for ion channels. *Biochem.Soc.Trans.* 2001, 29: 565-570
- Chumakov I**, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, Bougueleret L, Barry C, Tanaka H, La Rosa P, Puech A, Tahri N, Cohen-Akenine A, Delabrosse S, Lissarrague S, Picard FP, Maurice K, Essieux L, Millasseau P, Grel P, Debailleul V, Simon AM, Caterina D, Dufaure I, Malekzadeh K, Belova M, Luan JJ, Bouillot M, Sambucy JL, Primas G, Saumier M, Boubkiri N, Martin-Saumier S, Nasroune M, Peixoto H, Delaye A, Pinchot V, Bastucci M, Guillou S, Chevillon M, Sainz-Fuertes R, Meguenni S, Aurich-Costa J, Cherif D, Gimalac A, Van Duijn C, Gauvreau D, Ouellette G, Fortier I,

- Raelson J, Sherbatich T, Riazanskaia N, Rogaev E, Raeymaekers P, Aerssens J, Konings F, Luyten W, Macciardi F, Sham PC, Straub RE, Weinberger DR, Cohen N, Cohen D, Ouelette G, Realson J. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99: 13675-80.
- Cloniger** CR. The discovery of susceptibility genes for mental disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 13365-13367
- Das** MK, Basu A, Balaram P. Effects of membrane channel forming polypeptides on mitochondrial oxidative phosphorylation. A comparison of alamethicin, gramicidin A, melittin, and tetraacetylmelittin, *Biochem Int.*, 1985; 11: 357-363
- Das** MK, Raghothama S, Balaram P. Membrane channel forming polypeptides. Molecular conformation and mitochondrial uncoupling activity of antiamebin, an  $\alpha$ -aminoisobutyric acid containing peptide. *Biochemistry* 1986; 25: 7110-7117
- Degenkolb** T, Berg A, Gams W, Schlegel B & Gräfe U. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification *via* diagnostic fragment ions. *J. Pept. Sc.* 2003, accepted
- Degenkolb** T. Promotionsarbeit an der FSU Jena, 2000
- Dixon** DM, Traynor JR. Formation of [Leu5]-enkephalin from dynorphin A (1-8) by rat central nervous tissue in vitro. *J. Neurochem.* 1990; 54: 1379-1385
- Dörfelt** H, Jetschke G, (Hrsg). Wörterbuch der Mycologie. Spektrum Verlag, Heidelberg 2. Aufl. 2001; S.139
- Dornberger** K, Ihn W, Ritzau M, Gräfe U, Schlegel B, Fleck W, Metzger JW. Chrysospermins, new peptaibol antibiotics from *Apiocrea chrysosperma* Ap101. *J. Antibiot.* 1995; 48: 977-989
- Duclohier** H, Spach G. Artificial Membrane Excitability revisited and Implications for the gating of Voltage dependent Ion Channels. *Gen. Physiol. Biophys.* 2001; 20: 361-374 (a)
- Duclohier** H, Wroblewski H. Voltage-Dependent Pore Formation and Antimicrobial Activity by Alamethicin. *J. Membrane Biol.* 2001; 184, 1–12 (b)
- Duncan** GE, Sheitman BB, Liebermann JA. An integrated view of pathophysiological models of schizophrenia. *Brain res. Rev.* 1999; 29: 250-264
- Ehrenstein** G, Lecar H. Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* 1977; 10: 1-34
- Elliot** WH, Elliot DC. *Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press, Oxford, 1997; pp 63-64

**Engelberth J**, Koch T, Kühnemann F, Boland W. Ionenkanalbildende Peptaibole sind hochwirksame Elicitoren des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels und der Rankenkrümmung. *Angew. Chem.* 2000; 112: 1928-1930

**Engelberth J**, Koch T, Schuler G, Bachmann N, Rechtenbach J, Boland W. Ion channel forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendril coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signalling in Lima bean. *Plant Physiol.* 2001; 125: 369-377

**Ferneborn U**, Diplomarbeit an der FSU Jena, 2000

**Fieser M**. Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis. Wiley, NY, 1980; Vol. 8: 163

**Fonteriz RI**, Lopez MG, Garcia-Sancho J, Garcia AG. Alamethicin channel permeation by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 1991; 283: 89-92

**Fujita T**; Wada S; Iida A; Nishimura T; Kanai M; Toyama N. Fungal metabolites. XIII. Isolation and structural elucidation of new peptaibols, trichodecenins-I and -II, from *Trichoderma viride*. *Chem. Pharm. Bull.* 1994; 32: 489-494

**Gams W**, Diederich P, Pöldmaa K. Fungicolous fungi, in: *Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for fungi*. Müller G, Bills GF, Foster M, Eds, Academic Press, in press 2003.

**Gast K**, Siemer A, Zwirner D, Damaschun G. Fluoralcohol-induced structural changes of proteins: some aspects of cosolvent-protein interactions. *Eur. Biophys. J.* 2001; 30: 273-283

**Gräfe U.**; Heinze S.; Schlegel B.; Härtl A.: Disclosure of new and recurrent microbial metabolites by mass spectrometric methods. *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* 2001; 27: 136-143

**Gräfe U.**; Heinze S.; Ihn, W.: Massenspektrometrie. pp. 56 – 74. In: Adam KP., Becker H. Analytik biogener Arzneistoffe. Pharmazeutische Biologie Band 4. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2000

**Greksch**, Neuroleptie und Ampullosporin. Vortrag am HKI, 13.05.03

**Grigoriev PA**, Berg A, Schlegel B, and Gräfe U. Differences in ion permeability of an artificial bilayer membrane caused by ampullosporin and bergofungin, new 15-membered peptaibol type Antibiotics. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1997; 44: 155-158

**Grigoriev P.**, Schlegel, R., Dornberger, K., & Gräfe, U. Formation of membrane channels by chrysospermins, new peptaibolantibiotics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995; 1237: 135-148

**Habermehl**, Hamann, *Naturstoffchemie*, Springer Verlag Berlin, 1992, S.316

**Hara T**, Kodama H, Higashimoto Y, Yamaguchi H, Jelokhani-Niaraki M, Ehara T, Kondo M. Side chain effect on ion channel characters of Aib rich peptides. *J. Biochem.* 2001; 130: 749-755

**Härtl** A, Schlegel B, Dornberger K, Hülsmann H, Heinze S, Degenkolb T, Gregsch G, Gräfe U. Ampullosporin, a new microbial lead structure with neuroleptic activity from *Sepedonium ampullosporum*. Poster presentation, Symposium on Biotechnology of Natural Products, 1999, San Diego, CA, USA

**Heh** CW, Herrera J, DeMet E, Potkin S, Costa J, Sramek J, Hazlett E, Buchsbaum MS. Neuroleptic induced hypothermia associated with amelioration of psychosis in schizophrenia. *Neuropsychophar.* 1988; 1: 188-193

**Heinze** S.; Hülsmann H.; Schlegel R.; Gräfe U.: Advances of screening for natural compounds using mass spectrometric tools. pp. 167 – 176. *In*: Schreier, P.; Herderich, M.; Humpf, H.-U.; Schwab, W. (eds.): Natural Product Analysis: Chromatography – Spectroscopy – Biological Testing. Friedrich Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft mbH Braunschweig/Wiesbaden, 1998

**Heller** WT, He K, Ludtke S, Harroun TA, and Huang HW. Effect of changing the Size of Lipid Headgroup on Peptide Insertion into membranes. *Biophys. J* 1997; 73: 239-244

**Heller** WT, Waring AJ, Lehrer RI, Harroun TA, Weiss TM, Yang L, and Huang HW. Membrane Thinning Effect of the  $\beta$ -Sheet Antimicrobial Protegrin. *Biochemistry* 2000, 39: 139-145

**Henke** H. Präparative Gelchromatographie an LH20, Obernburg, 1994; S. 13f

**Hong** DP, Hoshino M, Kuboi R, Goto Y. Clustering of fluorine-substituted alcohols as a factor responsible for their marked effects on proteins and peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 1999; 121: 8427-8433

**Horner** L, Winkelmann H. N-Brom-Succinimid: Eigenschaften und Reaktionsweisen. *Angew. Chem.* 1959; 71: 349-392

**Huang** HW. Action of Antimicrobial Peptides: Two-State Model.. *Biochemistry*, 2000; 39: 8347-8352

**Hülsmann** H, Heinze S, Ritzau M, Schlegel B, and Gräfe U. Isolation and structure elucidation of peptaibolin, a new peptaibol from *Sepedonium* strains. *J. Antibiot.* 1998; 51: 1055-1058

**Hutchinson** EG, Thornton JM. PROMOTIF - A Program to Identify and Analyze Structural Motifs in Proteins. *Protein Sci.* 1996; 5: 212-220.

**Iida** A, Sanekata M, Fujita T, Tanaka H, Enoki A, Fuse G, Kanai M, Rudewicz PJ, Tachikawa E. Fungal metabolites. 16. Structures of new Peptaibols, Trichokinidin I-IVV, from the fungus *Trichoderma Harzianum*. *Chem. Pharm. Bull.* 1994; 42: 1070-1075



- Irmscher** G, Jung G. Die hämolytischen Eigenschaften der membranmodifizierenden Peptidantibiotika Alamethicin, Suzuokalicin und Trichotoxin. Eur. J. Biochem. 1977; 80: 165-174
- Jaworski** A, Brückner H. Sequence of Poypeptide Antibiotic Stilboflavin, natural Peptaibol Libraries of the mold *Stilbella flavipes*. J. Pept. Sc. 2001; 7: 433-447
- Jen** WC, Jones GA, Brewer D, Parkinson VO, Taylor A. The antibacterial activity of alamethicibns and zervamicins. J. Appl. Bacteriol. 1987; 63:293-298
- Johnson**, WCJr. Protein Secondary Structure and Circular Dichroism: A Practical Guide. Prot. Struc. Func. Gen., 1990; 7: 205-214
- Karle** I, Balaram P. Structural Characteristics of Alpha-Helical Peptide Molecules Containing Aib Residues. Biochemistry 1990; 29: 6747-6756.
- Katayama** T, Miyagawa K, Kodama T, Oikawa S. Trichorzin HA V, a member of the peptaibol family, stimulates intracellular cAMP formation in cells expressing the calcitonin receptor. Biol. Phar. Bull. 2001; 24: 1420-1422
- Keating** TA, Walsh CT. Initiation, elongation and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. Curr. Op. Chem. Biol. 1999; 3: 598-606
- Killian** JA, Heijne G. How protein adopt to membrane water interface. TIPS. 2000; 25: 429-434
- Kim** JS, Kornhuber HH, Schmid.Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. Neurosc. Lett 1980; 20: 379-382
- Kleinkauf** H, v. Döhren H. Biosynthesis of Peptide Antibiotics. Ann. Rev. Microbiol., 1987; 41: 259-89
- Kocher** S, Mouratou B, and Christen P. Amino Acid Analysis by HPLC after Derivatization with 1-F-2,4-Dinitrophenyl-5-L-alaninamid. Methods Mol. Biol 2000; 159: 49-54
- Krasnoff** SB, Gupta S, St. Leger RJ, Renwick JAA, Roberts DW. Antifungal and insecticidal properties of efrapeptin: Metabolites of the fungus *Tolypocladium niveum*. J. Invertebrate Path. 1991; 58: 180-188 (a)
- Krasnoff** SB, Gupta S. Identification and directed biosynthesis of efrapeptins in the fungus *Tolypocladium geodes* Gams (Deuteromycotina: Hyphomycetes). J. Chem. Ecol. 1991; 17: 1953-62 (b)
- Krüger-Velthusen** E. Dissertation an der FSU Jena, 2003
- Kubicek** CP., Harman GE. Trichoderma and Gliocladium, Vol 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Verlag Taylor and Francis, London, 1998

- Kuhn R**, Frischmann H und Löw I. Zur Permethylierung von Zuckern und Glykosiden. *Angew. Chem.* 1955; 67: 32
- Leclerc G**, Goulard C, Prigent Y, Bodo B, Wroblewski, H., and Rebuffat, S. Sequences and Antimycoplasic Properties of Longibrachins LGB II and LGB III, Two novel 20-residue Peptaibols from *Trichoderma longibrachiatum*. *J.Nat.Prod.*, 2001; 64: 164-170
- Leclerc G.**, Rebuffat S., Goulard C., and Bodo B. Directed Biosynthesis of Peptaibol Antibiotic in Two *Trichoderma* strains I Fermentation and Isolation. *J. Antibiotics*, 1998; 51: 170-177
- Lee SJ**, Yeo WH, Yun BS, Yoo ID. Isolation and sequence analysis of new peptaibol, boletusin, from *Boletus* spp. *J Pept Sci.* 1999;5(8):374-8. **(a)**
- Lee SJ**, Yun BS, Cho DH, Yoo ID. Tylopeptins A and B, new antibiotic peptides from *Tylophilus neofelleus*. *J Antibiot* . 1999 ;52(11):998-1006. **(b)**
- Lehmann J.** FSU Jena, persönliche Mitteilung
- Lehmann W.** Massenspektroskopie in der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1996
- Leistner E.**, Breckle SW. Pharmazeutische Biologie I, 4 Auflage 1992, S. 2ff, Thieme Verlag Stuttgart
- Lipman F.** Nonribosomal PolypeptideSynthesis on Polyzyme Templates. *Acc. Chem. Res.*, 1973; 6: 361-367
- Lottspeich F**; Zorbas H. (Hrsg.): Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin [1998]
- Manning M**, Woody RW. Theoretical CD Studies of polypeptides helices: examination of important electronic and geometric factors. *Biopolymers* 1991; 31: 569-586
- Mao D**, Wachter E, Wallace BA. Folding of the mitochondrial proton adenosinetriphosphatase proteolipid channel in phospholipid vesicles. *Biochemistry* 1982; 21: 4960-4968.
- McCann PA**, Bogell BM. Pamamycin: A new Antibiotic and Stimulator of Aerial Mycelia Formation. *J. Antibiot.* 1979; 32: 673-678
- Meerwein H.**, in Methoden der organischen Chemie (Houben Weyl), Bd. 6/3 S. 33f, G. Thieme Verlag Stuttgart 1965
- Menestrina G**, Voges KP, Jung G, Boheim G. Voltage dependent channel formation by rods of helical polypeptides. *J. Membr. Biol.* 1986; 96: 111-132
- Mitchell DA**, Berovic M, Krieger N. Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnol Annu Rev.* 2002;8:183-225.

- Mohr** H; Kleinkauf H. Alamethicin biosynthesis: acetylation of the amino terminus and attachment of phenylalaninol. *Biochim.Biophys.Acta*, 1978; 526: 375-396
- Mootz** HD, Marahiel MA. Biosynthetic systems for nonribosomal peptide antibiotic assembly. *Curr. Op. Chem. Biol.* 1997; 1: 543-551
- Müller** P. Membrane excitation through voltage-induced aggregation of channel precursors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1975; 264
- Müller** WE. Wirkungsmechanismen der atypischen Neuroleptika. *Pharm. uns. Zeit* 2002; 31: 537-544
- Nagaoka** Y, Iida A, Kambara T, Asami K, Tachikawa E, Fujita t. Role of proline residue in the channel forming and catecholamin releasing activities of the peptaibol, trichosporin-B-VIa. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1283: 31-36
- Nagaraj** G, Uma MV, Shivajogi MS, Balaram H. Antimalarial activities of peptide antibiotics isolated from fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 145-149
- Naoki** S. Synthesis of Saframycins. *Tetrahedron Lett.*, 1995; 51,: 8231–8246
- Natsuma** M. Pamamycins: Unique macrodiolides with aerial mycelium-differentiation-inducing activity in *Streptomyces alboniger*. *Recent Res. Devel. Agricultural & Biological Chem.* 1999; 3: 11-22
- Nguyen** HH, Imhof D, Kronen M, Gräfe U, and Reißmann S. Conformational study of ampullosporin A analogues. A circular dichroism study. *J. Pept. Sci.* 2003; accepted **(a)**
- Nguyen** HH. Promotion an der FSU Jena, , 2003; **(b)**
- Nguyen** HH, Imhof D, Kronen M, Schlegel B, Härtl A, Gräfe U, Gera L, and Reißmann S. Synthesis and Biological Evaluation of Analogues of the Peptaibol. *J. Med. Chem* 2002; 45: 2781-2787
- Nuhn**, *Naturstoffchemie*, Hirzel Verlag Stuttgart, 1997, S 684ff
- Oerther** S, Ahlenius S. Atypical antipsychotics and dopamin D1 receptor agonism: An in vivo experimental study using core temperature measurements in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000; 292: 731-736
- Oh** SU, Yun BS, Lee SJ, Kim JH, Yoo ID. Atroviridins A-C and neoatroviridins A-D, novel peptaibol antibiotics produced by *Trichoderma atroviride* F80317. I Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot.* 2002; 55: 557-564
- Otwinowski** Z, Minor W. Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods in Enzymology*, Vol. 276, Macromolecular Crystallography, Part A, Eds. C.W. Carter & R.M. Sweet, pp. 307-326, Academic Press, San Diego, 1997.

**Park** K, Perczel A, Fasman DG. Differentiation between transmembrane helices and peripheral helices by the deconvolution of circular dichroism spectra of membrane protein. *Protein Sci.* 1992; **1**: 1032-1049

**Paulsen** H. Fortschritte bei der selektiven chemischen Synthese komplexer Oligosaccharide *Angew. Chemie* 1982; 94: 184-201

**Popot** JL, Engelmann DM. Helical membrane protein folding, stability, and evolution. *Ann. Rev. Biochem.* 2000; 69: 881-922

**Rebuffat** S, Goulard C, Bodo B. Antibiotic peptides from trichoderma harzianum: harzianins HC, proline-rich 14-residue peptaibols. *J. Chem. Soc. Per. Trans.I* 1995; 14: 1849-1855

**Reiber** K. Promotionsarbeit an der FSU Jena. 2003;

**Reinefeld**, Erich; Heincke, Klaus D. Selective O-alkylation of sucrose. *Ber.* 1971; 104: 265-269.

**Rinehart**, KL, Gaudioso LA, Moore ML, Pandey RC, Cook JC, Barber M, Sedgwick RD, Bordoli RS, Tyler AN, Green BN. Structures of eleven zervamicin and two emerimicin peptide antibiotics studied by fast atom bombardment mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 1981, 103: 6517-6520

**Ritzau** M, Heinze S, Dornberger K, Berg A, Fleck W, Schlegel B, Härtl A, Gräfe U. Ampullosporin, a new peptaibol-type antibiotic from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053 with neuroleptic activity in mice. *J. Antibiot.* 1997; 50: 722-728

**Robinson** T, Singh D, Nigam P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001; 55:284–88

**Roepstorff**, P.; Hojrup, P.; Moller, J.: Evaluation of fast atom bombardment mass spectrometry for sequence determination of peptides. *Biomed. Mass Spectrometry*, 1985; 12: 181–188

**Rohl** CA, Baldwin RL. Comparison of NH exchange and circular dichroism as techniques for measuring the parameters of helix-coil transition in peptides. *Biochemistry* 1997; 36: 8435-8442.

**Roos** W, Schulze R, and Steighardt J. Dynamic compartmentation of vacuolar amino acids in *Penicillium cyclopium*: cytotoxic adenylates act as signal for efflux from the vacuole. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 15849-15855

**Sabesan** S, Neira S. Synthesis of 2-deoxy sugars from glycals. *J Org Chem.* 1991; 56: 5468-5472

- Sahr** T, Ammer H, Besl H, Fischer M. Infrageneric classification of the boleticolous genus *Sepedonium*: species determination and phylogenetic relationships. *Mycologia* 1999; 91: 935–943.
- Sakamoto** K, Izumi S, Miyauchi M, Okuhara M. A new assay method for immunosuppressants with a tacrolimus (FK506)-like mode of action. *J Antibiot.* 1995 Jul; 48: 727-729
- Sansom** MSP. Structure and function of channel-forming peptaibols. *Quart. Rev. Biophys.* 1993; 26: 365-421
- Schiell** M, Hofmann J, Kurz M, Schmidt FR, Vertesy L, Vogel M, Wink J, Seibert G. Cephaibols, new peptaibol antibiotics with anthelmintic properties from *Acremonium tubakii* DSM 12774. *J Antibiot.* 2001; 54: 220-33.
- Schlegel** B, Härtl A, Gräfe U. Pilze spüren neue Wirkstoffe auf. *Forschungsmagazin FSU Jena* 2000; 9: 12-15
- Schmidt** RR. New Methods for the Synthesis of Glycosides and Oligosaccharides - are there Alternatives to the Königs-Knorr Method. *Angew. Chemie* 1986; 98: 213-236
- Schügerl** K, Seidel G. Prozeßtechnische Aspekte der Produktion mit mycelbildenden Mikroorganismen. *C.I.T.*, 1998; 70: 93-101
- Schwarzer** D, Marahiel MA. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, 2001; 88: 93-101
- Shai** Y, Oren Z. From „carpet“ mechanism to de-novo designed diastereomeric cell-selective antimicrobial peptides. *Peptides*, 2001; 22: 1629-1641
- Shai** Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1462:55-77
- Sheldrick** GM. Phase Annealing in SHELX-90: Direct Methods for Larger Structures. *Acta Crystallogr. Sect. A* 1990; 46: 467-473.
- Sheldrick** GM. SHELXL-97, University of Göttingen, Germany, 1997.
- Snatzke** G (Ed). *Optical Rotary Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry.* Heyden & son, London, 1967
- Snatzke** G. Chiroptische Methoden in der Stereochemie Teil I. *Chemie in unserer Zeit*, 1981; 3: 78-87
- Snook** CF, Wooley GA, Olivia G, Pattabhi V, Wood SF, Blundell TL, Wallace BA. The structure and function of antiameobin I, a proline-rich membrane-active polypeptide. *Structure* 1998; 6: 783-792

**SYBYL** Software: Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, Missouri 63144, USA (www.tripos.com). SYBYL is a Registered Trademark of Tripos, Inc.

**te Biesebeke**, R, Ruijter G, Rahardjo YS, Hoogschagen MJ, Heerikhuisen M, Levin A, van Driel KG, Schutyser MA, Dijksterhuis J, Zhu Y, Weber FJ, de Vos WM, van den Hondel KA, Rinzema A, Punt PJ. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations. Progress report on a multi-disciplinary project. FEM Yeast Res. 2002; 2(2):245-8.

**Thirumalachar** M. J. Antiamoebin, a new antiprotozoal-anthelmintic antibiotic. I. Production and biological studies. Hindustan Antibiot. Bull. 1968; 10:287-289

**Ti Tien** H.; and Ottova Leitmannova A. Membrane Biophysics as viewed from experimental bilayer lipid membranes, Elsevier-Verlag Amsterdam 2000

**Tieleman** DP, Sansom MS, Berendsen HJ. Alamethicin Helices in a Bilayer and in Solution: Molecular Dynamics Simulations. Biophys. J. 1999; 76: 40-49.

**Toniolo** C, Polese A, Formaggio F, Crisna M, Kamphuis J. Circular dichroism spectrum of a peptide  $3_{10}$ -helix. J. Am. Chem. Soc. 1996; 118: 2744-2745

**Traber** R, Loosli HR, Hofmann H, Kuhn M und v. Wartburg A. Isolierung und Strukturermittlung der neuen Cyclosporine E –I. Helv. Chim. Acta 1982; 65: 1655-77

**Tsantrizos** YS, Pischos S, Sauriol F, Widden P. Peptaibol metabolites of *Tolypocladium geodes*. Can. J. Chem. 74 (1996) 165 – 172

**Voet** D, Voet JG. Biochemie. Übersetzung Maelicke A, VCH Weinheim, 1992; S. 114

**von Döhren** H, Dickmann R, Pavela-Vranicic M. The nonribosomal code Chem. Biol. 1999; 6: R273-279

**von Döhren** H, Gräfe U. General aspects of Secondary Metabolism. In Biotechnology Vol. 7, ed. Rehm and Reed, VCH, Weinheim 1997; pp: 1-55

**Wada** S, Iida A, Akimoto N, Kanai M, Toyama N, Fujita T. Fungal metabolites. XIX. Structural elucidation of channel-forming peptides, trichorovins-I-XIV, from the fungus *Trichoderma viride*. Chem. Pharm. Bull. 1995; 43: 910 – 915

**Whitmore** L., Chugh J., Datenbank Peptaibole <http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.htm>

**Wiest** A, Grzegorski D, Xu BW, Goulard C, Rebuffat S, Ebbole DJ, Bodo B, Kenerly C. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of peptaibol synthetase. J. Biol. Chem. 2002; 277:20862-20868

**Witkop** B. Chemical cleavage of proteins. Science 1968; 162: 318-326

**Witt** T, Hock FJ, Lehmann J. 7-Methyl-6,7,8,9,14,15-hexahydro-5H-benz[d]indolo[2,3-g]azine: A new heterocyclic system and new lead compound for dopamine receptor antagonist. J. Med. Chem. 2000; 4: 2079-81

- Woody** RW. Circular dichroism. *Methods Enzymol.* 1995; 246: 34-71
- Wooley** GA, Epand RM, Kerr ID, Sansom MS,II and Wallace B. A. Alamethicin Pyromellitate: An Ion-Activated Channel-Forming Peptide *Biochemistry* 1994, 33: 6850-6858
- Yau** WM, William CW, Gawrisch K, Stephen HW. The preference of tryptophan for membrane interface. *Biochemistry* 1998; 37: 14713-14718
- Yehuda** S. Hypothermie effects of antipsychotic phenothiazines. In *Impact Biol. Mod. Psychatry, Proc. Symp.* 1975, Hrsg.: Gershon ES, Belmaker RH, Kety SS. Plenum New York 1977; 137-148
- Yun** BS, You ID, Kim YS, Lee SJ, Kim KS, Yeo WH. Peptaivirins A and B, two new antiviral peptaibols against TMV infection. *Tetrahedron Lett.* 2000; 41: 1429-1431
- Zhou** FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *PNAS.* 2001; **98**: 2250-2255.
- Zuber** P. Non-ribosomal peptide sythesis. *Curr. Op. Cell Biol.* 1991; 3: 1046-1050

## **6. Abbildungen und Tabellen**

- 6.1. Allgemeine physikalischen Daten der Ampullosporine B-E und der Derivate
- 6.2. Abbildungen und Tabellen zur Massenspektrometrie
  - 6.2.1. ESI-Tandem MS von Ampullosporin B
  - 6.2.2. ESI-Tandem MS von Ampullosporin C
  - 6.2.3. ESI-Tandem MS von Ampullosporin D
  - 6.2.4. ESI-Tandem MS von Ampullosporin E<sub>1</sub> und E<sub>4</sub>
  - 6.2.5. ESI-Tandem MS von Ampullosporin E<sub>2</sub> und E<sub>3</sub>
  - 6.2.6. ESI-Tandem MS von Ampullosporin NMK006
  - 6.2.7. ESI-Tandem MS von Ampullosporin NMK010
  - 6.2.8. ESI-Tandem MS von Ampullosporin NMK011
  - 6.2.9. ESI-Tandem MS von Ampullosporin NMK012
  - 6.2.10. Tabellarische Zusammenfassung der Massen der diagnostischen Fragmente
- 6.3. Chemische Verschiebungen
  - 6.3.1. Chemische Verschiebung von <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C von Ampullosporin B
  - 6.3.2. Chemische Verschiebung von <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C von Ampullosporin C
  - 6.3.3. Chemische Verschiebung von <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C von Ampullosporin D
  - 6.3.4. Chemische Verschiebung von <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C von Ampullosporin NMK006
  - 6.3.5. Chemische Verschiebung von <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C von Ampullosporin NMK010
  - 6.3.6. Chemische Verschiebung von <sup>1</sup>H und <sup>13</sup>C von Ampullosporin NMK011
- 6.4. Kristallographische Angaben und Daten der RSA des Ampullosporins A
  - 6.4.1. Kristallographische Daten und Details der Datenaufzeichnung und dem Daten-Refinement von Ampullosporin A
  - 6.4.2. Torsionswinkel der Peptidkette und der Seitengruppen des Ampullosporin A



Produkt	HR-MS [m+Na] <sup>+</sup>	Clac	RT	Drehwert	MP	Aussehen	Summenformel
Amp B	1630,9284	1630,9272	15,4		232-233 Zersetzung	farblos	C <sub>76</sub> H <sub>125</sub> N <sub>19</sub> O <sub>19</sub>
Amp C	1630,9283	1630,9272	15,3	-26,1 -25,8	157-159 Zersetzung	farblos	C <sub>76</sub> H <sub>125</sub> N <sub>19</sub> O <sub>19</sub>
Amp D	1630,9281	1630,9272	15,2	-25,7 -23,3	182-184 Zersetzung	farblos	C <sub>76</sub> H <sub>125</sub> N <sub>19</sub> O <sub>19</sub>
Amp E	1616,9137	1616,9133	14,9		222-224 Zersetzung	farblos	C <sub>75</sub> H <sub>123</sub> N <sub>19</sub> O <sub>19</sub>
NMK006	1394,8702 [M+H] <sup>+</sup>	1394,8735	10,5			farblos	C <sub>64</sub> H <sub>115</sub> N <sub>17</sub> O <sub>17</sub>
NMK010	1664,9727 [M+H] <sup>+</sup>	1664,9740	14,8			farblos	C <sub>79</sub> H <sub>129</sub> N <sub>19</sub> O <sub>20</sub>
NMK011	1895,0579 [M+H] <sup>+</sup>	1895,0530	15,1		175,6	gelb	C <sub>89</sub> H <sub>143</sub> N <sub>19</sub> O <sub>26</sub>
NMK012			17,5			farblos	

Tab. 6.1: Physikalische Kenndaten der Ampullosporin-Analoga B-E<sub>4</sub> und NMK006, 010, 011 und 012

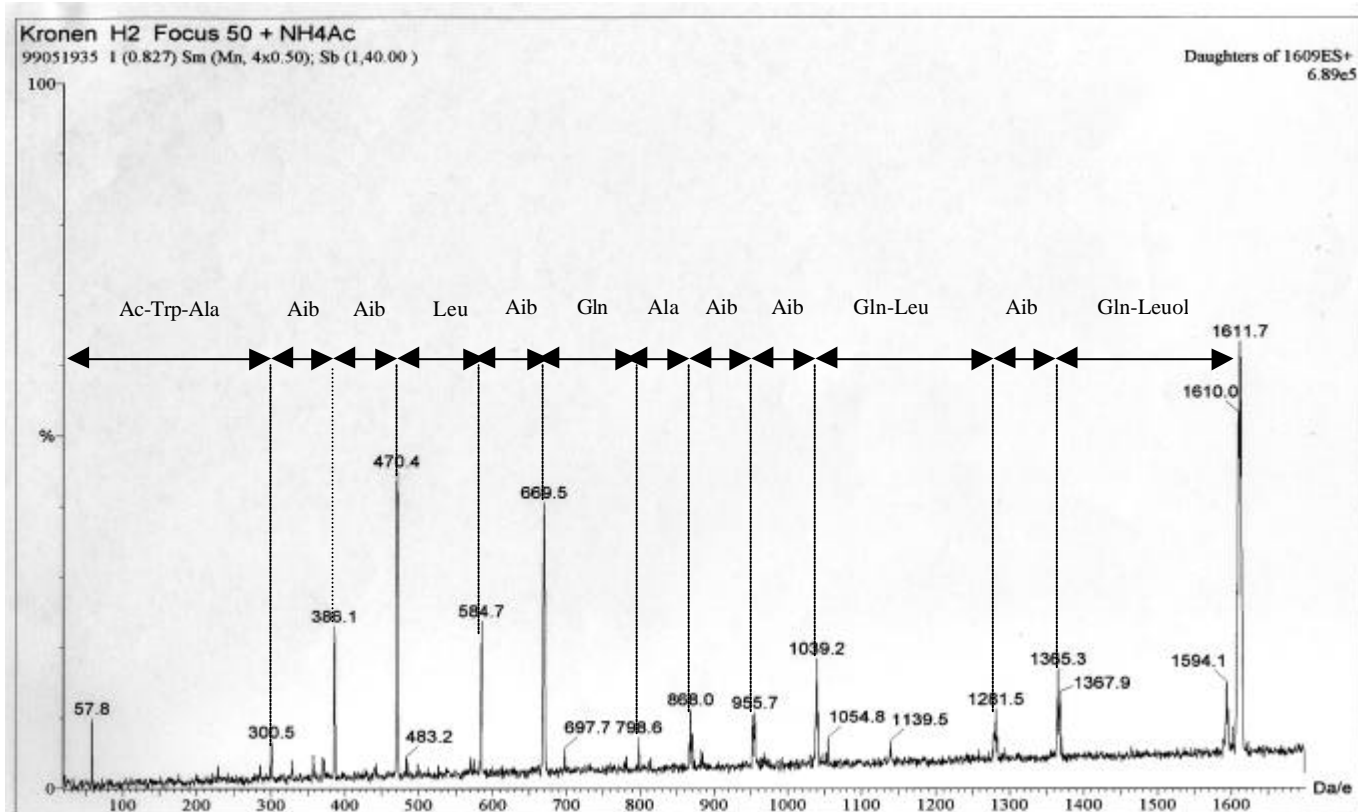


Abb. 6.2.1: ESI-Tandem-MS von Ampullosporin B

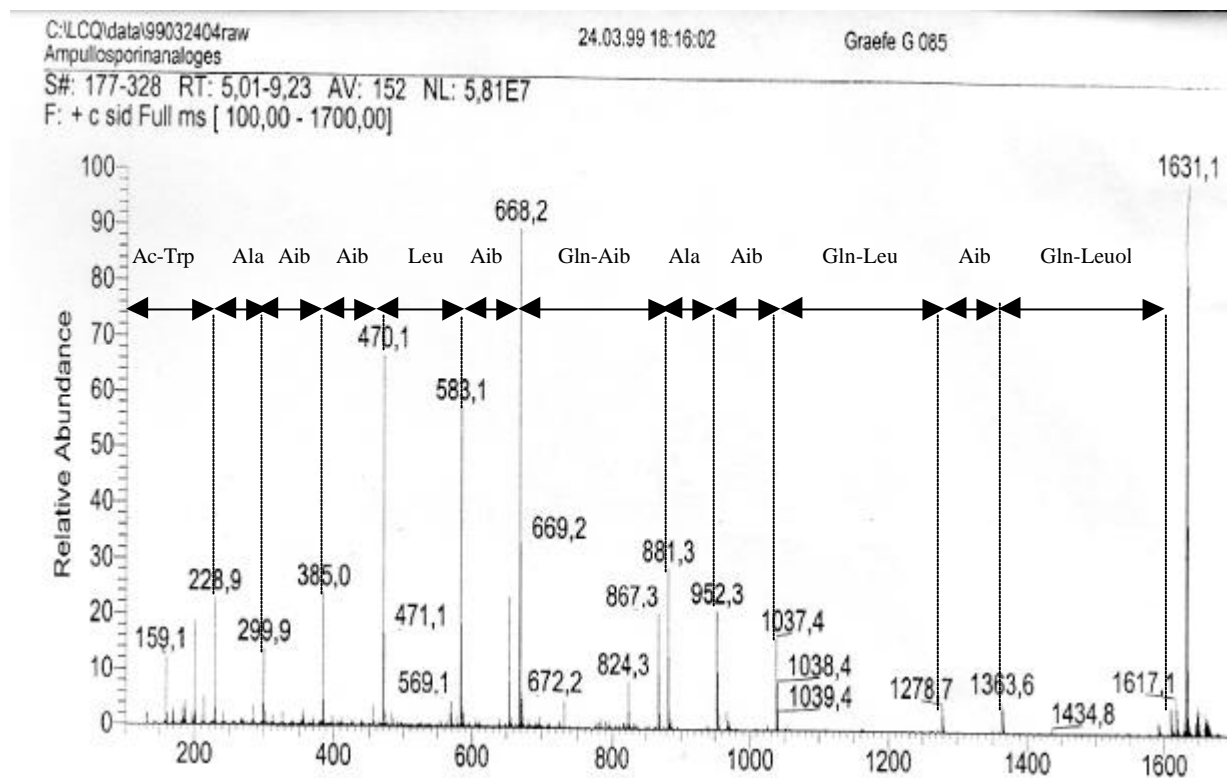


Abb. 6.2.2.: ESI-Tandem-MS von Ampullosporin C

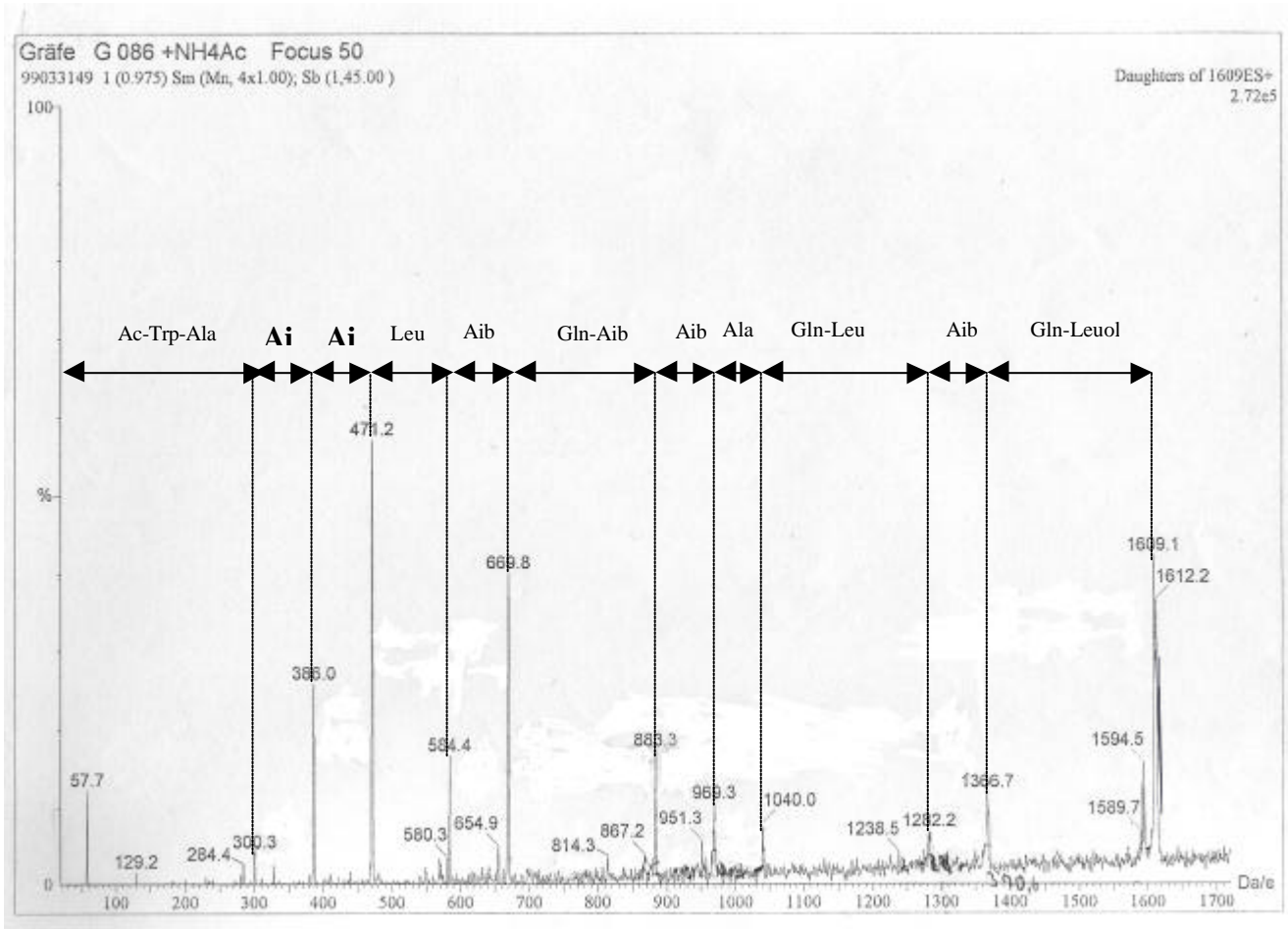


Abb. 6.2.3.: ESI-Tandem-MS von Ampullosporin D

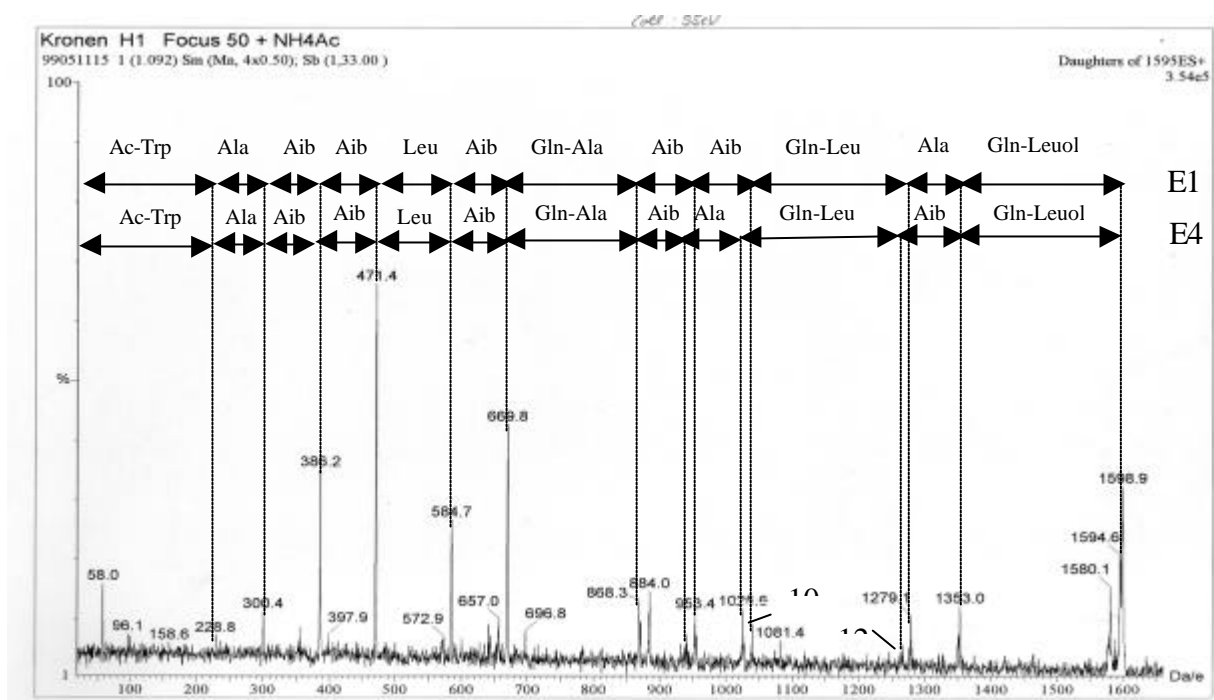


Abb. 6.2.4.: ESI-Tandem-MS von den Ampullosporinen E<sub>1</sub> und E<sub>4</sub>

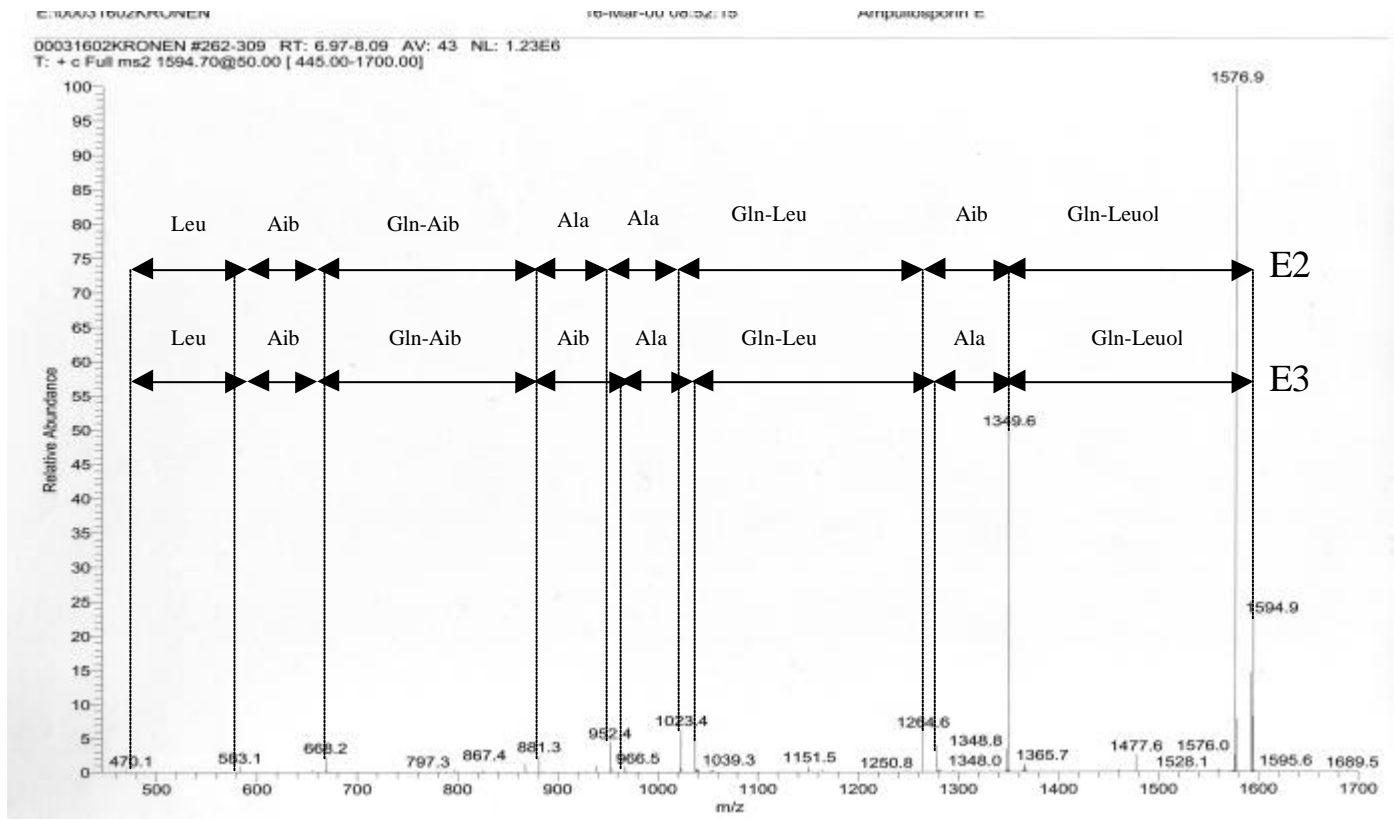


Abb. 6.2.5.: ESI-Tandem-MS von den Ampullosporinen E<sub>2</sub> und E<sub>3</sub>

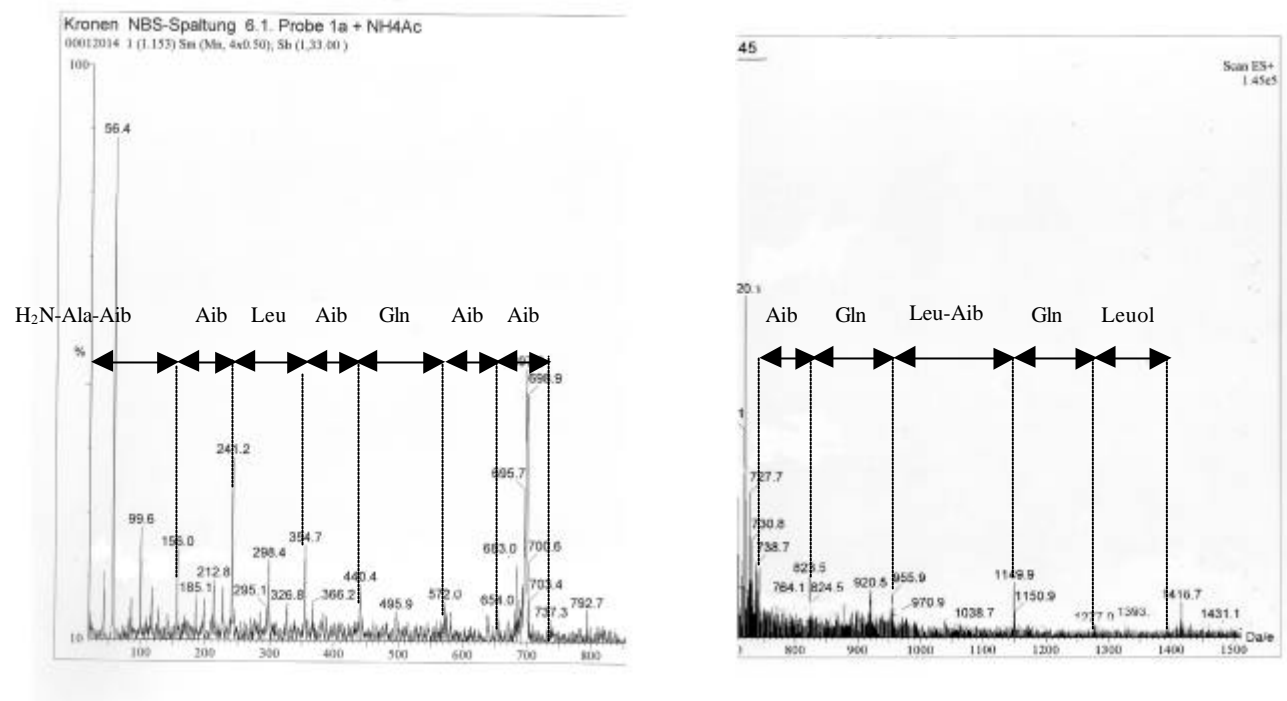


Abb. 6.2.6.: ESI-Tandem-MS von NMK006

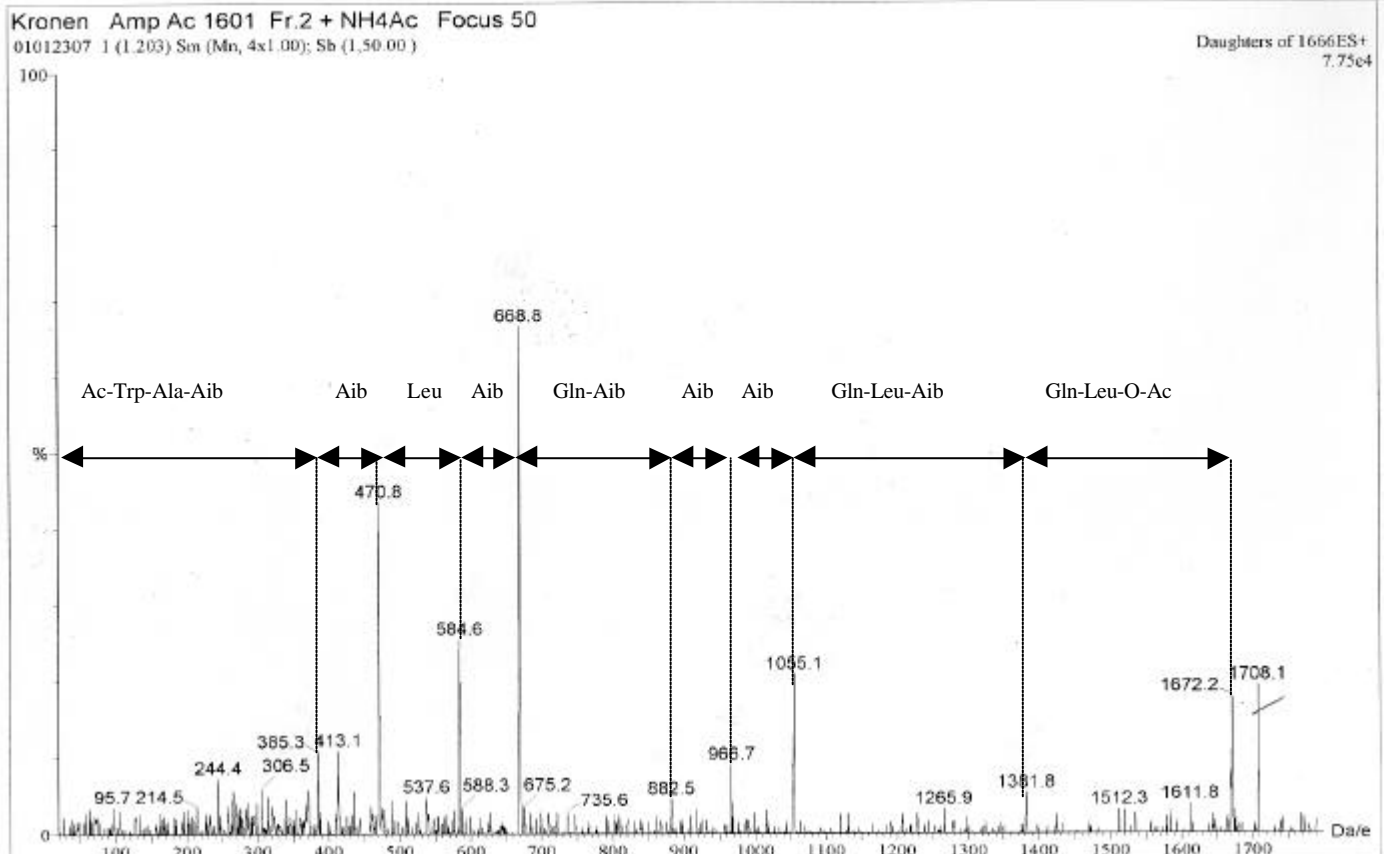


Abb. 6.2.7.: ESI-Tandem-MS von NMK010

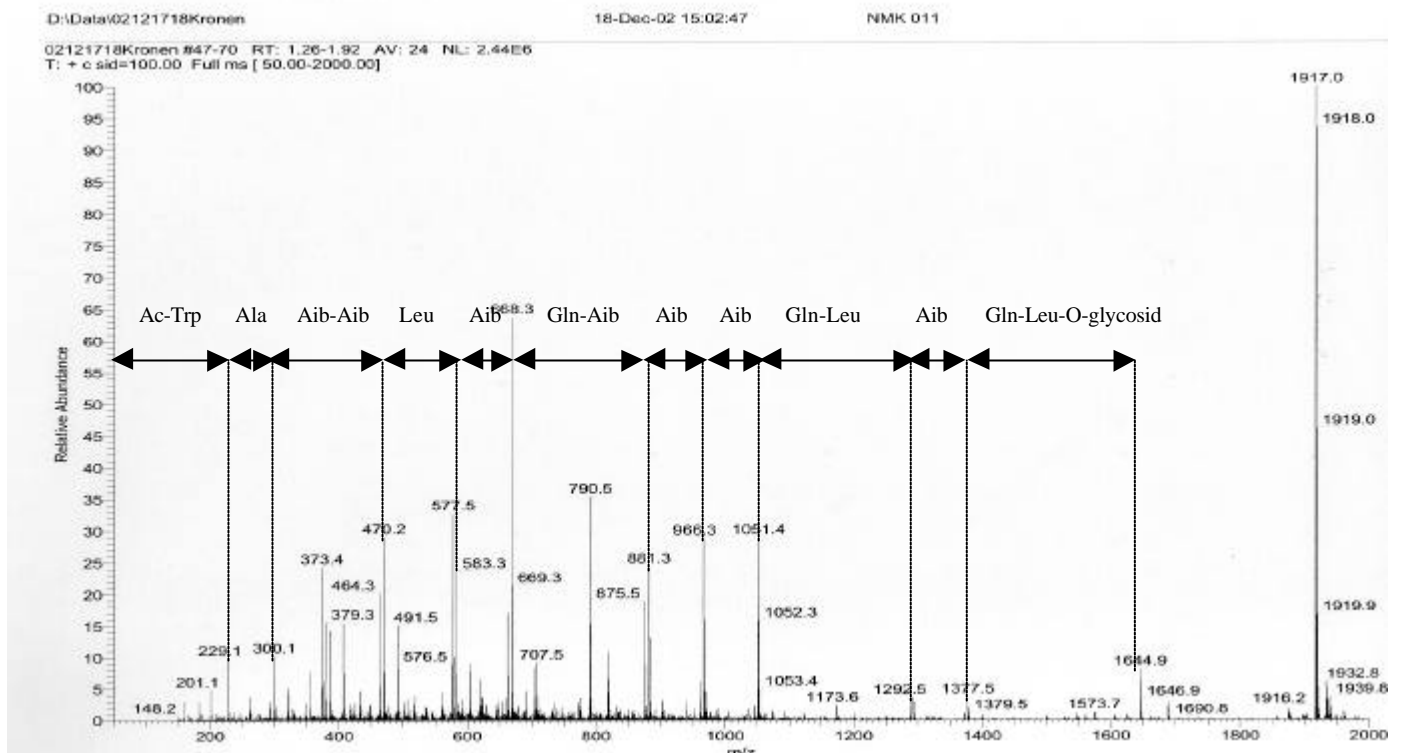


Abb. 6.2.8.: ESI-Tandem-MS von NMK011

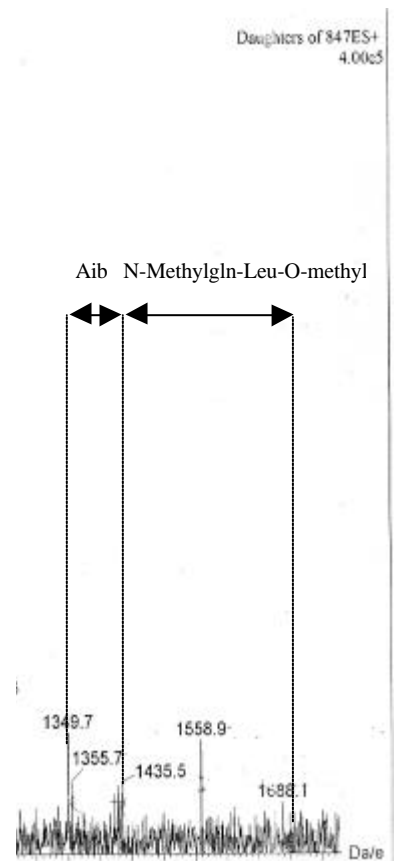
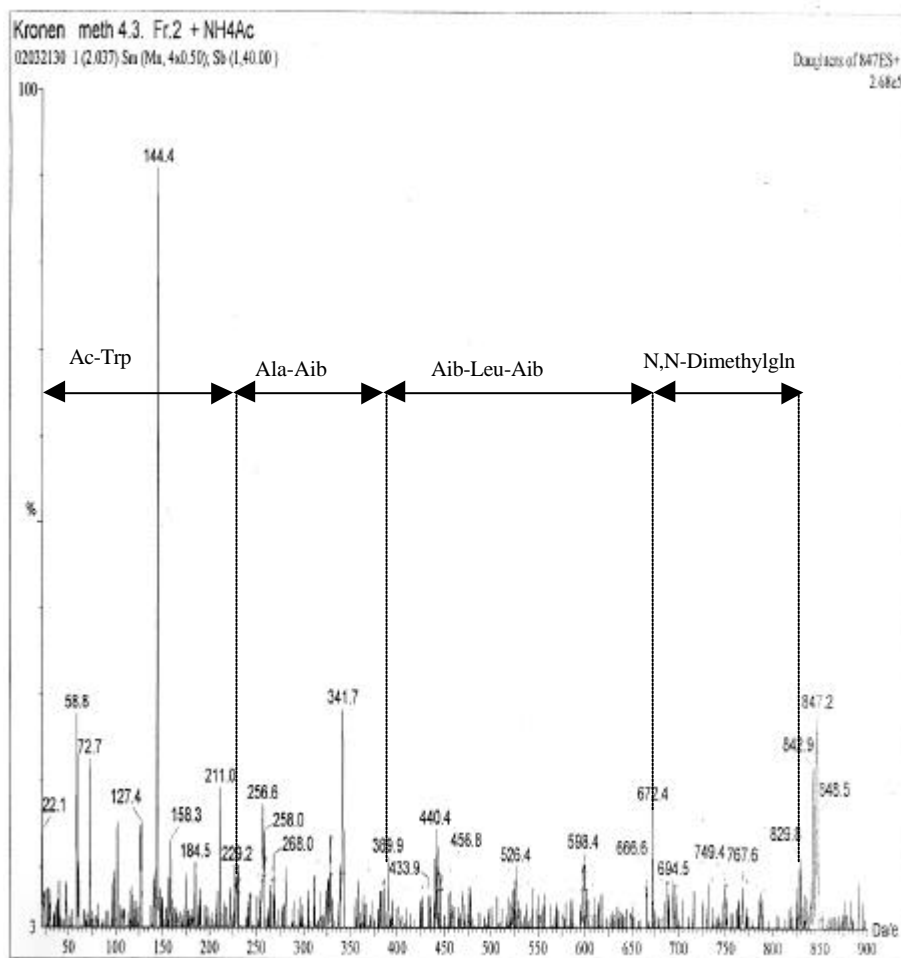


Abb. 6.2.9.: ESI-Tandem-Ms von NMK012

Tab. 6.2.10.: Fragmentierungsmuster der Ampullosporin-Analoga Ampullosporine B-E<sub>4</sub> und NMK006, 010, 011 und 012

	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	b <sub>4</sub>	b <sub>5</sub>	b <sub>6</sub>	b <sub>7</sub>	b <sub>8</sub>	b <sub>9</sub>	b <sub>10</sub>	b <sub>11</sub>	b <sub>12</sub>	b <sub>13</sub>	b <sub>14</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+ Na] <sup>+</sup>
A	229	300	385	470	583	668		881	966	1051		1292	1377		1622	
B	229	300	385	470	583	668		867	952	1037		1278	1363		1608	
C	229	300	385	470	583	668		881	952	1037		1278	1363		1608	
D	229	300	385	470	583	668		881	966	1037		1278	1363		1608	
E1	229	300	385	470	583	668		867	952	1037		1278	1349		1594	
E2	229	300	385	470	<b>583</b>	668		881	952	1023		1264	1349		1594	
E3	229	300	385	470	583	668		881	966	1037		1278	1349		1594	
E4	229	300	385	470	583	668		867	938	1023		1264	1349		1594	
006		156	241	355	441	572	654	738	824	955		1150	1277		1394	
010			385	471	584	669		882	967	<b>1055</b>			<b>1381</b>			1664
011	229	300		470	583	668		881	966	1051		1292	1377		1644	1917
012	229	(304)	389			672	830					1350	1435		1706	

Tab.6.3.1: Chemische Verschiebung des Ampullosporin B.

Da keine 2-D-Spektren vorliegen, erfolgte die Zuordnung anhand von Spektrenvergleich aus den anderen Spektren und der ACD-Software [ACD/NMR Databases, Version 4.0, 1999] zur Berechnung von  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren.

Rest	Proton	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
Ac0	CH3	1,84 s	22,63
	CO		170,49
Trp1	NH	8,19 d, 6,0	
	$\alpha$	4,38 m	54,69
	$\beta$ 1	2,97 dd, 15,4; 5,9	27,13
	$\beta$ 2	3,11 dd, 15,1; 4,4	
	1'	10,81	
	2'	7,20	123,67
	3'		109,80
	3'a		127,23
	4'	7,54 d, 8,0	118,20
	5'	6,93 t, 7,5	118,12
	6'	7,04 t, 7,6	120,89
	7'	7,31 d, 7,6	111,32
	7'a		136,08
	CO		173,30
Ala2	NH	8,14 d, 5,4	
	$\alpha$	4,02 m	50,48
	$\beta$	1,22 d, 7,0	15,98
	CO		174,28
Aib3	NH	8,20 s	
	$\alpha$		55,73
	$\beta$ 1	1,33 s	22,30
	$\beta$ 2	1,36 s	25,69
	CO		174,91
Aib4	NH	8,01 s	
	$\alpha$		55,55
	$\beta$ 1	1,33 s	22,39
	$\beta$ 2	1,38 s	26,82
	CO		176,58
Leu5	NH	7,65	
	$\alpha$	3,88 d 4,8	54,60
	$\beta$ 1	1,56 m	39,16
	$\beta$ 2	1,70 m	



Aib6	$\gamma$	1,75 m	24,52
	$\delta 1$	0,83 d, 6,3	21,41
	$\delta 2$	0,91 d 6,6	22,40
	CO		174,14
	NH	7,84 s	
	$\alpha$		55,78
	$\beta 1$	1,34 s	23,26
	$\beta 2$	1,45 s	26,61
Gln7	CO		175,41
	NH	7,37 d, 5,5	
	$\alpha$	3,80 dt, 6,6; 4,7	56,22
	$\beta 1$	1,94 m	25,80
	$\beta 2$	2,00 m	
	$\gamma 1$	2,10 m	31,03
	$\gamma 2$	2,20 m	
	$\delta$		172,95
	$\epsilon 1$	6,73 s	
	$\epsilon 2$	7,20 s	
Ala8	CO		173,01
	NH	8,12 d, 5,3	
	$\alpha$	3,89 m	51,67
	$\beta$	1,42 d, 7,6	16,35
	CO		174,85
Aib9	NH	7,99 s	
	$\alpha$		55,50
	$\beta 1$	1,34 s	22,44
	$\beta 2$	1,39 s	26,61
	CO		175,73
Aib10	NH	7,47	
	$\alpha$		55,57
	$\beta 1$	1,36 s	22,75
	$\beta 2$	1,48 s	26,61
	CO		176,23
Gln11	NH	7,68 d, 6,0	
	$\alpha$	3,98 m	55,15
	$\beta 1$	1,94 m	26,18
	$\beta 2$	2,00 m	
	$\gamma 1$	2,08 m	31,90
	$\gamma 2$	2,34 m	

Leu12	$\delta$		173,38
	$\epsilon 1$	6,72 s	
	$\epsilon 2$	7,20 s	
	CO		173,86
	NH	7,31 d, 7,6	
	$\alpha$	4,05 m	52,85
	$\beta 1$	1,62 m	39,00
	$\beta 2$	1,66 m	
	$\gamma$	1,69 m	24,11
	$\delta 1$	0,84 d, 6,3	21,10
Aib13	$\delta 2$	0,89 d, 6,6	22,50
	CO		173,52
	NH	7,45	
	$\alpha$		56,05
	$\beta 1$	1,39 s	24,38
	$\beta 2$	1,36 s	25,34
Gln14	CO		174,05
	NH	7,17 d, 8,2	
	$\alpha$	3,96 m	53,30
	$\beta 1$	1,80 m	27,13
	$\beta 2$	2,00 m	
	$\gamma 1$	2,07 m	31,67
	$\gamma 2$	2,11 m	
	$\delta$		173,80
Leuol15	$\epsilon 1$	6,67 s	
	$\epsilon 2$	7,10 s	
	CO		170,76
	NH	7,01 d 8,7	
	$\alpha$	3,75 m	48,66
	$\beta 1$	1,32 m	39,84
	$\beta 2$	1,36 m	
	$\beta 1'$	3,17 dd, 11,0; 6,8	63,86
	$\beta 2'$	3,30 m	
	$\gamma$	1,63 m	23,92
	$\delta 1$	0,79 d, 6,9	21,76
	$\delta 2$	0,81 d 6,7	23,47

Tab. 6.3.2: Chemische Verschiebung des Ampullosporins C

Rest	Proton	$\delta_H$	$\delta_C$
Ac0	CH3	1,86 s	22,65
	CO		170,72
Trp1	NH	8,33 (d, 6,1)	
	$\alpha$	4,40 (ddd, 10,4 8,8, 5,8)	54,75
	$\beta_1$	3,00 (dd, 16,4; 7,6)	27,00
	$\beta_2$	3,06 (dd,16,9; 4,1)	
	1'	10,80 (d, 2,8)	
	2'	7,20 (d, 2,3)	123,59
	3'		109,66
	3'a		127,12
	4'	7,52 (d, 7,7)	118,19
	5'	6,93 (t, 7,5)	118,15
	6'	7,03 (t, 7,4)	120,82
	7'	7,32 (d, 8,1)	111,26
	7'a		136,03
	CO		173,58
Ala2	NH	8,28 (d, 5,0)	
	$\alpha$	4,01 (dq, 7,3; 5,0)	50,62
	$\beta$	1,22 (d, 6,8)	15,94
	CO		174,92
Aib3	NH	8,30 (br, s)	
	$\alpha$		55,50
	$\beta_1$	1,36 (s)	22,38
	$\beta_2$	1,37 (s)	25,78
	CO		174,96
Aib4	NH	8,04	
	$\alpha$		55,86
	$\beta_1$	1,33 (s)	22,33
	$\beta_2$	1,37 (s)	26,60
	CO		176,71
Leu5	NH	7,67(s, br)	
	$\alpha$	3,87 (m)	54,83
	$\beta_1$	1,62 (m)	39,17
	$\beta_2$	1,77 (m)	
	$\gamma$	1,71 (m)	24,41
	$\delta_1$	0,89 (d, 7,0)	21,36
	$\delta_2$	0,91 (d, 7,2)	22,26

Aib6	CO		174,33
	NH	7,84 (br, s)	
	$\alpha$		56,00
	$\beta$ 1	1,33 (s)	23,42
	$\beta$ 2	1,44 (s)	26,58
Gln7	CO		176,00
	NH	7,37 (d, 5,7)	
	$\alpha$	3,80 (dt, 7,3; 4,5)	56,21
	$\beta$ 1	1,94 (m)	26,05
	$\beta$ 2	1,99 (m)	
	$\gamma$ 1	2,11 (m)	30,85
	$\gamma$ 2	2,19 (m)	
	$\delta$		173,23
	$\epsilon$ 1	6,72 (br, s)	
	$\epsilon$ 2	7,18 (br, s)	
Aib8	CO		174,08
	NH	8,04 (br, s)	
	$\alpha$		
	$\beta$ 1	1,33 (s)	22,55
	$\beta$ 2	1,42 (s)	25,77
Ala9	CO		175,26
	NH	7,92	
	$\alpha$	3,95 (m)	50,68
	$\beta$	1,46 (d, 7,6)	16,13
Aib10	CO		175,08
	NH	7,58 (br, s)	
	$\alpha$		55,24
	$\beta$ 1	1,33 (s)	22,25
	$\beta$ 2	1,40	26,35
Gln11	CO		176,25
	NH	7,70 (br, d, 5,9)	
	$\alpha$	3,93 (m)	55,20
	$\beta$ 1	1,96 (m)	26,08
	$\beta$ 2	2,01 (m)	
	$\gamma$ 1	2,13 (m)	31,95
	$\gamma$ 2		
	$\delta$		173,30
	$\epsilon$ 1	6,66 (br, s)	
	$\epsilon$ 2	7,11 (br,s)	

Leu12	CO		173,55
	NH	7,46 (d, 4,5)	
	$\alpha$	4,03 (m)	52,69
	$\beta$ 1	1,64 (m)	39,01
	$\beta$ 2	1,65 (m)	
	$\gamma$	1,70 (m)	24,16
	$\delta$ 1	0,82 (d, 6,3)	21,13
	$\delta$ 2	0,83 (d, 6,0)	
Aib13	CO		173,05
	NH	7,55 (br, s)	
	$\alpha$		56,11
	$\beta$ 1	1,36 (s)	24,05
	$\beta$ 2	1,40 (s)	25,40
Gln14	CO		173,90
	NH	7,16 (br, d, 8,2)	
	$\alpha$	3,98 (m)	53,33
	$\beta$ 1	1,31 (m)	27,25
	$\beta$ 2	2,01 (m)	
	$\gamma$ 1	2,05 (m)	31,68
	$\gamma$ 2	2,21 (m)	
	$\delta$		173,91
	$\epsilon$ 1	6,66 (br, s)	
	$\epsilon$ 2	7,06 (br, s)	
Leuol15	CO		170,96
	NH	7,02 (d, 8,8)	
	$\alpha$	3,74 (m)	48,59
	$\beta$ 1	1,31 (m)	39,85
	$\beta$ 2	1,35 (m)	
	$\beta$ 1'	3,18 (m)	63,94
	$\beta$ 2'	3,31 (dd, 10,4; 4,0)	
	$\gamma$	1,63(m)	23,87
	$\delta$ 1	0,79 (d, 4,6)	21,65
	$\delta$ 2	0,80 (d, 4,1)	23,05

Tab. 6.3.3: Chemische Verschiebung des Ampullosporins D

Rest	Proton	$\delta_H$	$\delta_C$
Ac0	CH3	1,85	22,63 (q)
	CO		170,56 (s)
Trp1	NH	8,32 (d, 7,5)	
	$\alpha$	4,38 (ddd, 9,5, 7,5, 4,4)	54,81 (d)
	$\beta_1$	2,97 (dd, 15,0, 9,5)	27,14 (t)
	$\beta_2$	3,11 (dd, 15,0, 4,4)	
	1'	10,82 (d,2,8)	
	2'	7,20 (d,2,8)	123,69 (d)
	3'		109,86 (s)
	3'a		127,23 (s)
	4'	7,53 (d, 7,9)	118,21 (d)
	5'	6,93 (t, 7,9)	118,12 (d)
	6'	7,03 (t, 7,9)	120,88 (d)
	7'	7,31 (d, 7,9)	111,33 (d)
	7'a		136,09 (s)
	CO		173,15 (s)
Ala2	NH	8,38 (br,d, 5,3)	
	$\alpha$	4,02 (dq, 7,2, 5,3)	50,64 (d)
	$\beta$	1,24 (d,7,2)	15,96 (q)
	CO		174,29 (s)
Aib3	NH	8,33 8br,s)	
	$\alpha$		55,71 (s)
	$\beta_1$	1,35 (s)	22,30 (q)
	$\beta_2$	1,36 (s)	25,70 (q)
	CO		174,90 (s)
Aib4	NH	8,01 (br, s)	
	$\alpha$		55,59 (s)
	$\beta_1$	1,33 (s)	22,39 (q)
	$\beta_2$	1,37 (s)	26,79 (q)
	CO		176,62 (s)
Leu5	NH	7,69 (d, 5,5)	
	$\alpha$	3,88 (m)	54,60 (d)
	$\beta_1$	1,56 (m)	38,92 (t)
	$\beta_2$	1,77 (m)	
	$\gamma$	1,71 (m)	24,51 (d9
	$\delta_1$	0,82 (d, 6,6)	21,43 (q)
	$\delta_2$	0,91 (d, 6,6)	22,30 (q)

Aib6	CO		174,08 (s)
	NH	7,83 (br, s)	
	$\alpha$		55,78 (s)
	$\beta$ 1	1,33 (s)	23,23 (q)
	$\beta$ 2	1,45 (s)	26,64 (q)
Gln7	CO		175,76(s)
	NH	7,37 (br, d, 5,4)	
	$\alpha$	3,80 (dt, 7,0, 5,4)	56,23 (d)
	$\beta$ 1	1,95 (m)	25,97 (t)
	$\beta$ 2	1,99 (m)	
	$\gamma$ 1	2,11 (m)	31,03 (t)
	$\gamma$ 2	2,20 (m)	
	$\delta$		173,02 (s)
	$\epsilon$ 1	6,72 (br, s)	
	$\epsilon$ 2	7,19 (br,s)	
Aib8	CO		173,02 (s)
	NH	8,03 (br,s)	
	$\alpha$		55,56 (s)
	$\beta$ 1	1,32 (s)	22,60 (q)
	$\beta$ 2	1,43 (s)	25,80 (q)
Aib9	CO		175,42 (s)
	NH	8,00 (br,s)	
	$\alpha$		55,50 (s)
	$\beta$ 1	1,34 (s)	22,39 (q)
	$\beta$ 2	1,39 (s)	26,61 (q)
Ala10	CO		176,24 (s)
	NH	7,56 (br, d, 5,2)	
	$\alpha$	3,90 (dq, 7,5, 5,2)	51,69 (d)
	$\beta$	1,42 (d, 7,5)	16,37 (q)
	CO		174,94 (s)
Gln11	NH	7,84 (br, d, 5,6)	
	$\alpha$	3,96 (m)	55,17(d)
	$\beta$ 1	1,96 (m)	26,17 (t)
	$\beta$ 2	2,04 (m)	
	$\gamma$ 1	2,12 (m)	31,91 (t)
	$\gamma$ 2	2,34 (m)	
	$\delta$		173,41 (s)
	$\epsilon$ 1	6,72 (br, s)	
	$\epsilon$ 2	7,18 (br, s)	

Leu12	CO		173,41 (s)
	NH	7,47 (d, 7,7)	
	$\alpha$	4,06 (m)	52,89 (d)
	$\beta$ 1	1,62 (m)	38,86 (t)
	$\beta$ 2	1,64 (m)	
	$\gamma$	1,69 (m)	24,13 (d)
	$\delta$ 1	0,81 (d, 6,5)	21,07(q)
	$\delta$ 2	0,84 (d, 6,7)	22,50 (q)
Aib13	CO		172,91 (s)
	NH	7,48 (br, s)	
	$\alpha$		56,07 (s)
	$\beta$ 1	1,36 (s)	24,36 (q)
	$\beta$ 2	1,39 (s)	25,38 (q)
Gln14	CO		173,89 (s)
	NH	7,16 (br, d, 7,8)	
	$\alpha$	3,97 (m)	53,33 (d)
	$\beta$ 1	1,80 (m)	27,14 (t)
	$\beta$ 2	1,99 (m)	
	$\gamma$ 1	2,06 (m)	31,69 (t)
	$\gamma$ 2	2,19 (m)	
	$\delta$		173,89 (s)
	$\epsilon$ 1	6,67 (br, s)	
	$\epsilon$ 2	7,06 (br, s)	
Leu15	CO		170,78 (s)
	NH	7,02 (d, 8,1)	
	$\alpha$	3,75 (m)	48,67 (d)
	$\beta$ 1	1,31 (m)	39,77 (t)
	$\beta$ 2	1,34 (m)	
	$\beta$ 1'	3,18 (dd, 10,4, 7,0)	63,89 (t)
	$\beta$ 2'	3,30 (dd, 10,4, 5,0)	
	$\gamma$	1,63 (m)	23,93 (d)
	$\delta$ 1	0,79 (d, 6,7)	21,77 (q)
	$\delta$ 2	0,83 (d, 6,7)	23,47 (q)



Tab. 6.3.4: Chemische Verschiebung von NMK006. Da keine 2-D-Spektren vorliegen, erfolgte die Zuordnung anhand von Spektrenvergleich aus den anderen Spektren und der ACD-Software [ACD/NMR Databases, Version 4.0, 1999] zur Berechnung von  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren.

Rest	Proton	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
Ala1	NH	9,03	
	$\alpha$	3,96 m	48,23
	$\beta$	1,46 d, 4,0	16,38
	CO		169,68
Aib2	NH	8,27	
	$\alpha$		55,75
	$\beta_1$	1,35 s	22,22
	$\beta_2$	1,36 s	25,59
	CO		175,14
Aib3	NH	8,17 s	
	$\alpha$		55,61
	$\beta_1$	1,33 s	22,68
	$\beta_2$	1,38 s	26,41
	CO		176,10
Leu4	NH	7,44 d 6,6	
	$\alpha$	3,88 m	53,78
	$\beta_1$	1,62 m	39,84
	$\beta_2$	1,76 m	
	$\gamma$	1,72 m	24,51
	$\delta_1$	0,84 d 6,1	21,59
	$\delta_2$	0,93 d 5,7	22,22
	CO		174,29
Aib5	NH	7,84 br, s	
	$\alpha$		56,00
	$\beta_1$	1,33 s	22,95
	$\beta_2$	1,40 s	26,40
	CO		175,41
Gln6	NH	7,38 d 5,7	
	$\alpha$	3,75 m	56,18
	$\beta_1$	1,94 m	26,02
	$\beta_2$	1,97 m	
	$\gamma_1$	2,14 m	31,19
	$\gamma_2$	2,19 m	

Aib7	$\delta$		173,18
	$\epsilon 1$	6,73	
	$\epsilon 2$	7,17	
	CO		173,18
	NH	7,74 s	
	$\alpha$		55,87
	$\beta 1$	1,35 s	22,82
	$\beta 2$	1,41 s	25,76
	CO		175,19
	NH	7,73 s	
Aib8	$\alpha$		55,50
	$\beta 1$	1,33 s	22,45
	$\beta 2$	1,40 s	26,61
	CO		175,45
	NH	7,54	
	$\alpha$		55,50
	$\beta 1$	1,31 s	22,45
	$\beta 2$	1,39 s	26,61
	CO		175,98
	NH	7,88 d 9,2	
Gln10	$\alpha$	3,92 m	55,30
	$\beta 1$	1,95 m	26,41
	$\beta 2$	2,04 m	
	$\gamma 1$	2,16 m	31,88
	$\gamma 2$	2,35 m	
	$\delta$		173,40
	$\epsilon 1$	6,69	
	$\epsilon 2$	7,19	
	CO		173,75
	NH	7,72 d 6,9	
Leu11	$\alpha$	4,07 m	52,73
	$\beta 1$	1,63 m	39,68
	$\beta 2$	1,65 m	
	$\gamma$	1,74 m	24,12
	$\delta 1$	0,80 d 6,6	20,89
	$\delta 2$	0,82 d 6,1	22,45
	CO		173,09
	NH	7,46 s	
	$\alpha$		56,16
Aib12			

Gln13	$\beta 1$	1,35 s	23,87
	$\beta 2$	1,40 s	25,24
	CO		173,82
	NH	7,23 d 7,6	
	$\alpha$	3,98 m	53,29
	$\beta 1$	1,91 m	27,04
	$\beta 2$	2,05 m	
	$\gamma 1$	2,09 m	31,63
	$\gamma 2$	2,17 m	
	$\delta$		173,70
	$\epsilon 1$	6,76	
	$\epsilon 2$	7,12	
	CO		170,71
Leuol14	NH	7,06 d 8,7	
	$\alpha$	3,75 m	48,67
	$\beta 1$	1,33 m	39,51
	$\beta 2$	1,35	
	$\beta 1'$	3,18 m	63,92
	$\beta 2'$	3,30 dd 10,4; 5,0	
	$\gamma$	1,61 m	23,95
	$\delta 1$	0,81 d 7,4	21,72
	$\delta 2$	0,83 d 6,1	23,95

Tab. 6.3.5: Chemische Verschiebung von NMK010

Rest	Proton	$\delta_H$	$\delta_C$
Ac0	CH3	1,84 s	22,67
	CO		170,41
Trp1	NH	8,15 d, 5,4	
	$\alpha$	4,36 ddd,	54,57
	$\beta 1$		26,93
	$\beta 2$	3,08 d, 4,5?	
	1'	10,81 d, 0,9	
	2'	7,21 d, 2,1	123,63
	3'		109,78
	3'a		127,20
	4'	7,54 d, 7,4	118,15

	5'	6,92 t, 7,2	118,07
	6'	7,02 t, 7,1	120,83
	7'	7,30 d, 8,0	111,28
	7'a		136,05
	CO		173,02
Ala2	NH	8,15 d, 5,4	
	$\alpha$	4,02 d, 6,8	50,40
	$\beta$	1,22 d, 7,1	15,95
	CO		174,07
Aib3	NH	8,22 br, s	
	$\alpha$		55,76
	$\beta$ 1	1,37 s	25,78
	$\beta$ 2	1,33 s	22,32
	CO		174,80
Aib4	NH	7,97 br, s	
	$\alpha$		55,68
	$\beta$ 1	1,38 s	26,80
	$\beta$ 2	1,33 s	22,48
	CO		176,81
Leu5	NH	7,65 d, 6,1	
	$\alpha$	3,91 m	54,38
	$\beta$ 1	1,57 m	38,94
	$\beta$ 2	1,68 m	
	$\gamma$	1,63 m	24,47
	$\delta$ 1	0,82 d, 5,4	21,47
	$\delta$ 2	0,90 d, 5,5	22,41
	CO		173,97
Aib6	NH	7,80 br, s	
	$\alpha$		55,87
	$\beta$ 1	1,46 s	26,73
	$\beta$ 2	1,35 s	22,48
	CO		175,96
Gln7	NH	7,36 d, 6,3	
	$\alpha$	3,77 dt, 10,0; 6,1	
	$\beta$ 1	1,94 m	26,00
	$\beta$ 2	2,01 m	
	$\gamma$ 1	2,11 m	31,07
	$\gamma$ 2	2,19 m	
	$\delta$		173,20

Aib8	$\epsilon 1$	6,71 br, s	
	$\epsilon 2$	7,18 br, s	
	CO		173,35
	NH	7,93 br, s	
	$\alpha$		
Aib9	$\beta 1$	1,41 s	25,64
	$\beta 2$	1,33 s	22,59
	CO		175,18
	NH	7,89 br, s	
	$\alpha$		
Aib10	$\beta 1$	1,39 s	26,37
	$\beta 2$	1,35 s	22,32?
	CO		175,13
	NH	7,56 br, s	
	$\alpha$		55,60
Gln11	$\beta 1$	1,48 s	26,55
	$\beta 2$	1,35 s	22,67?
	CO		176,50
	NH	7,75 br, d 4,8	
	$\alpha$	3,93 m	55,49
Leu12	$\beta 1$	1,96 m	
	$\beta 2$	2,04 m	
	$\gamma 1$	2,09 m	31,90
	$\gamma 2$	2,34 m	
	$\delta$		173,60
Aib13	$\epsilon 1$	6,68 br, s	
	$\epsilon 2$	7,18 br, s	
	CO		173,76
	NH	7,65 br, d 6,1	
	$\alpha$	4,06 m	53,30
Aib13	$\beta 1$	1,58 m	38,67
	$\beta 2$	1,68 m	
	$\gamma$	1,72 m	24,07
	$\delta 1$	0,82 d, 5,4	20,83
	$\delta 2$	0,85 d, 5,6	23,25?
Aib13	CO		173,40
	NH	7,45 br, s	
	$\alpha$		56,20
	$\beta 1$	1,40 s	26,00

Gln14	$\beta 2$	1,37 s	24,02
	CO		173,67
	NH	7,23 br, d 7,8	
	$\alpha$	3,98 m	
	$\beta 1$	1,93 m	
	$\beta 2$	2,04 m	
	$\gamma 1$	2,10 m	31,59
	$\gamma 2$	2,19 m	
	$\delta$		173,97
	$\epsilon 1$	6,96 br, s	
Leu15	$\epsilon 2$	7,11 br, s	
	CO		170,94
	NH	7,06 br	
	$\alpha$	3,80m	
	$\beta 1$	1,3	39,50
	$\beta 2$		
	$\beta 1'$	3,14 m	65,68
	$\beta 2'$	3,30m	
	$\gamma$		
	$\delta 1$		21,31
Ac	$\delta 2$		
	CO		170,18
	CH3	1,97 s	20,52?

Abb. 6.3.6: Chemische Verschiebung von NMK011

Rest	Proton	$\delta_H$	$\delta_C$
Ac0	CH3	1,83 s	20,38
	CO		170,77
Trp1	NH	8,16, d 6,2	
	$\alpha$	4,38 m	54,51
	$\beta 1$	2,98 d 9,1	27,14
	$\beta 2$	3,12 d 4,5	
	1'	10,78 d 0,5	
	2'	7,20 d 2,1	123,61
	3'		109,79
	3'a		127,21

	4'	7,52 d 7,4	118,20
	5'	6,94 t 7,4	118,08
	6'	7,05 t 7,5	120,85
	7'	7,32 d 8,1	111,27
	7'a		136,05
	CO		173,23
Ala2	NH	8,18 d 5,7	
	$\alpha$	4,15 dq 6,9; 4,4	50,38
	$\beta$	1,22 d 7,0	15,99
	CO		174,06
Aib3	NH	8,15 s	
	$\alpha$		55,70
	$\beta$ 1	1,33 s	22,42
	$\beta$ 2	1,36 s	25,65
Aib4	CO		176,50
	NH	7,97 s	
	$\alpha$		55,61
	$\beta$ 1	1,33 s	22,42
Leu5	$\beta$ 2	1,38 s	26,75
	CO		175,97
	NH	7,67 m	
	$\alpha$	3,87 m	54,42
	$\beta$ 1	1,55 m	38,94
	$\beta$ 2	1,76 m	
	$\gamma$	1,70 m	24,48
	$\delta$ 1	0,83 d 6,8	21,46
	$\delta$ 2	0,89 d 6,2	22,33
	CO		
Aib6	NH	7,77 s	
	$\alpha$		56,77
	$\beta$ 1	1,34 s	23,26
	$\beta$ 2	1,44 s	26,35
Gln7	CO		175,67
	NH	7,38 d 5,6	
	$\alpha$	3,81 d 6,43	56,20
	$\beta$ 1	1,95 m	25,98
	$\beta$ 2		
	$\gamma$ 1		31,07
	$\gamma$ 2	2,20 m	

Aib8	$\delta$		172,92
	$\epsilon$ 1	6,70 s	
	$\epsilon$ 2	7,21 s	
	CO		173,02
	NH	7,97 s	
	$\alpha$		55,50
	$\beta$	1,31 s	22,59
	$\beta$ 2	1,44 s	26,56
Aib9	CO		175,45
	NH	7,90 s	
	$\alpha$		55,90
	$\beta$ 1	1,35 s	22,48
	$\beta$ 2	1,39 s	26,38
	CO		176,38
	NH	7,57 s	
	$\alpha$		55,70
Aib10	$\beta$ 1	1,36 s	22,60
	$\beta$ 2	1,46 s	27,05
	CO		176,02
	NH	7,88 br, d 6,0	
	$\alpha$	3,92 m	55,61
	$\beta$ 1	1,93 m	26,38
	$\beta$ 2	2,07	
	$\gamma$ 1	2,18 m	31,91
Gln11	$\gamma$ 2	2,33 m	
	$\delta$		173,42
	$\epsilon$ 1	6,70 br, s	
	$\epsilon$ 2	7,14 br, s	
	CO		173,48
	NH	7,74 d 6,3	
	$\alpha$	4,03 m	53,01
	$\beta$ 1	1,62 m	38,94
Leu12	$\beta$ 2	1,64 m	
	$\gamma$	1,68 m	24,08
	$\delta$ 1	0,79 d 6,2	21,31
	$\delta$ 2	0,88 d 6,2	22,75
	CO		173,60
	NH	7,77 s	
	$\alpha$		56,20
Aib13			



Gln14	$\beta 1$	1,36 s	24,46
	$\beta 2$	1,39 s	25,65
	CO		173,85
	NH	7,05 d 7,7	
	$\alpha$	3,97 m	53,01
	$\beta 1$	1,91 m	27,14
	$\beta 2$	1,98 m	
	$\gamma 1$	2,20 m	39,78
	$\gamma 2$	2,23 m	
	$\delta$		173,97
	$\epsilon 1$	6,70 br, s	
	$\epsilon 2$	7,07 br, s	
	CO		170,91
	NH	7,03 d 7,5	
Leuol15	$\alpha$	3,74 m	46,20
	$\beta 1$	1,28 m	39,50
	$\beta 2$	1,33 m	
	$\beta 1'$	3,15 m	67,33
	$\beta 2'$	3,24 m	
	$\gamma$	1,65 m	23,90
	$\delta 1$	0,81 d 6,8	21,57
	$\delta 2$	0,85 d 6,8	23,34
	1	4,40 t 9,8	96,26
	2 ax	1,94 d 6,6	34,43
Triacetylglu	eq	2,21 d 6,6	
	3	5,10 td 10,4; 5,4	68,57
	4	5,08 m	69,97
	5	3,98 m	
	6 ax	4,36 d 0,3	62,03
	eq	4,41 d 0,3	
	1'		169,96
	2'	2,07 s	20,44
	1''		169,44
	2''	2,07 s	20,58
	1'''		170,00
	2'''	2,07 s	20,84

Tab. 6.4.1: Kristallographische Daten und Details der Datenaufzeichnung und dem Daten-Refinement von Ampullosporin A.

$R1 = [\sum ||F_o| - |F_c||] / \sum |F_o|$ ,  $wR2 = [(\sum w(|F_o|^2 - |F_c|^2)^2) / (\sum w(F_o^2))]^{1/2}$ ,  $w = 1/[(\sigma F_o)^2 + (aP)^2]$ . Der  $aP$  –Wert wurde aus dem Strukturrefinement gewonnen.

Summenformel	$C_{77}H_{127}N_{19}O_{19} \cdot C_2H_3N \cdot 2H_2O$
Molekulargewicht [g·mol <sup>-1</sup> ]	1700.06
Dimension [mm <sup>3</sup> ]	$0.12 \times 0.12 \times 0.10$
Aussehen	farbloses Prisma
Kristallsystem	monoclin
Space group	$P2_1$ (No. 7)
$\lambda$ [Å]	0.71073
Temperatur [K]	183
Unit cell dimensions	
$a$ [Å]	19.9914(4)
$b$ [Å]	9.9246(3)
$c$ [Å]	25.4809(5)
$\beta$ [°]	111.572(1)
Cell volume [Å <sup>3</sup> ]	4701.5(2)
No. of formula units $Z$	2
Dichte (berechnet) $D_c$ [g×cm <sup>-3</sup> ]	1.201
Absorptionskoeffizient $\mu$ (Mo $K_\alpha$ ) [cm <sup>-1</sup> ]	0.88
$2\theta$ range [°]	3.32 – 55.06
Auflösung [Å]	0.77
Unique total data	18190
Observed data with $I > 2\sigma(I)$	12835
No. of variables / restraints	1177 / 1
$R$ [ $I > 2\sigma(I)$ ] <sup>a)</sup>	$R1 = 0.0512$
	$wR2 = 0.1294$
$R$ (all data) <sup>a)</sup>	$wR1 = 0.0747$
	$wR2 = 0.1390$
Goodness-of-fit	0.901
Largest diff. peak and hole [eÅ <sup>-3</sup> ]	0.758 / - 0.351

Tab. 6.4.2: Torsionswinkel der Peptidkette und der Seitengruppen des Ampullosporin A

Aminosäure	$\varphi$	$\psi$	$\omega$	$\chi^1$	$\chi^2$	$\chi^3$
Trp1	-79	-27	174	-73	-74/104	
Ala2	-65	-51	175			
Aib3	-53	-53	-172			
Aib4	-59	-50	-173			
Leu5	-71	-41	178	-71	170/-65	
Aib6	-54	-47	-176			
Gln7	-72	-43	177	-64	172	3/-175
Aib8	-50	-48	-175			
Aib9	-57	-52	-178			
Aib10	-53	-45	-170			
Gln11	-82	-31	-175	-60	-176	-117/64
Leu12	-94	0	-163	-66	-69/168	
Aib13	-56	-24	176			
Gln14	-134	23	176	53	169	-45/136
Leuol15	-128			-72	168/-67	

## **7. Anhang**

## **Aus der Arbeit hervorgegangene Veröffentlichungen**

Kronen M, Kleinwächter P, Schlegel B, Härtl A, Gräfe U. Ampullosporins B, C, D, E1, E2, E3, and E4 from *Sepedonium ampullosporum* HKI-0053: Structures and biological activities. J. Antibiot. 2001; 54: 175-178

Kronen M, Görls H, Nguyen HH, Reißmann S, Bohl M, Sühnel J, Gräfe U. Crystal Structure and Conformational Analysis of Ampullosporin A. J. Pept. Sci. 2003; accepted

Grigoriev PA, Kronen M, Schlegel B, Härtl A, Gräfe U. Differences in ion-channel formation by ampullosporins B, C, D, and semisynthetic desacetyltryptophanyl ampullosporin A. Bioelectrochem. 2002; 57: 119-121

Nguyen HH, Imhof D, Kronen M, Schlegel B, Härtl A, Gräfe U, Gera L, and Reißmann S. Synthesis and Biological Evaluation of Analogues of the Peptaibol Ampullosporin A. J. Med. Chem 2002; 45: 2781-2787

Nguyen HH, Imhof D, Kronen M, Gräfe U, and Reißmann S. Conformational study of ampullosporin A analogues. A circular dichroism study. J. Pept. Sci. 2003; accepted

Grigoriev PA, Schlegel B, Kronen M, Berg A, Härtl A, Gräfe U. Differences in membrane pore formation by peptaibols. J. Pept. Sci. 2003; accepted

## **Ehrenwörtliche Erklärung:**

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist, die vorliegende Arbeit selbständig, nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt und bisher keiner anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsarbeit vorgelegt wurde.

Jena, den 2. Juli 2003

Matthias Kronen

## Lebenslauf

Name Matthias Kronen

Geburtsstag 04.03.1969

Geburtsort Dorsten / Westf.

### Ausbildung

1976-79 St. Antonius Grundschule, Dorsten

1979-89 St. Ursula Gymnasium, Dorsten

Abschluß: allg. Hochschulreife

1990-91 Studium der Lebensmittelchemie, TU Berlin

1991-96 Studium der Lebensmittelchemie, Uni Bonn

Abschluß: 1. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker

1997-98 Praktisches Jahr bei Fa. Dr. Oetker und beim Lebensmittelunter-  
suchungsamt, Bielefeld

Abschluß: 2. Staatsexamen für Lebensmittelchemiker

1999-2002 Doktorand am HKI, Abt. Biostrukturchemie (Prof. Gräfe)

Seit 09.02 wissenschaftl. Angestellter am HKI, Synthese von Siderophormimetika  
auf Saccharidbasis

## **Danksagung**

Mein erster und größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gräfe für das interessante Thema, die kenntnisreiche Betreuung, die Raum für selbständiges Arbeiten ließ, und seine große menschliche Güte. Leider hat er durch seinen unerwarteten Tod das Ende der Arbeit nicht mehr mitgestaltet.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Reißmann, der die Betreuung der Arbeit mit großem Interesse übernommen hat.

Großer Dank gilt Fr. Dr. Nguyen, bei der Hilfe bei den CD-Messungen, der Auswertung der RSA und für die Hinweisen und Ideen.

Weiterhin danke ich den Kollegen für Hinweise, Anregungen und experimentelle Hilfestellung:

Fr. Dr. Schlegel für die Einarbeitung und Hilfe bei dem biologischen Teil der Arbeit.

Dr. Dornberger, der bei chemischen Fragen insbesondere in der HPLC wertvolle Hinweise und Anregungen gab.

Fr. Ing. Perner und Fr. Koch für die massenspektrometrischen Messungen;

Dr. Gollmick und Fr. Rhein für die Messung der NMR-Spektren und die wertvolle Hilfe bei spektroskopischen Fragen.

Dr. Härtl für die Betreuung der Tierversuche.

Dr. Grigoriev für die Einführung und Betreuung bei den Membranmessungen

Dr. Görls, Dr. Bohl und Dr. Sühnel für die Aufnahme der RSA, der Hilfe bei der Auswertung der Meßdaten und die Erstellung der Abbildungen zur Kristallstruktur.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung Biostrukturchemie am Hans-Knöll-Institut, insbesondere Fr. Karkowski für die Hilfe im Labor, Fr. Schwinger und Fr. Stöckl für die Durchführung der biologischen Tests und Dr. Berg, Dr. Kasch und Dr. Gebhardt für das Interesse am Thema und den Anregungen.

Natürlich bedanke ich mich auch bei meinen „Mitstreitern“ Thomas Degenkolb, der die Arbeit durchgesehen hat, Susanne Heggemann, Eva Krüger-Velthusen, Kathrin Reiber, Kerstin Herold, Kirstin Scherlach und Corina Pfeifer.